



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-016117- -00000-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

SC

PATENTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-195499- -00019-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 3

21. EXPEDIENTE No. _____

T = F = 3

54. TÍTULO “PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF-α”

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE ABBVIE, INC.

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

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

27 ENE 2015

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)



No. 12-195499-00019-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



No. 15-016117-00000-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

Trámite: 11
Evento: 379
Actuación: 851

CONVEI

JES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del Solicitante:

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

ABBVIE, INC.

Nombre o Denominación / Nombre o Razón Social Completa

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre Representante Legal

Tipo de Empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de Identificación

☒ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

39.690.713

Nacionalidad / País de Constitución	Dirección y Domicilio del Titular	Ciudad
Estado de Delaware, Estados Unidos de América	1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, Estados Unidos de América.	North Chicago
Dirección Electrónica		Número Telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		3264270
Fax		Número Telefónico
6069701		3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del Apoderado:

LLOREDA RICAURTE ALICIA

Apellidos y Nombre

C.C. 39.690.713

Documento de Identificación

53.215

Tarjeta Profesional

Dirección y Domicilio		Ciudad
Calle 72 No. 5-83 Piso 5º		Bogotá D.C.
Dirección Electrónica		Número Telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		3264270
No. Fax		Número Telefónico
6069701		3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del Trámite		
CONVERSIÓN Expediente No. _____ De: _____ A: _____	DIVISIÓN Expediente No. 12-195.499 No. Divisionales 1	FUSIÓN Expediente No. _____ Expediente No. _____

5. Comprobante de Pago No. 15-006970	Fecha: Enero 20, 2015

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación. ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación. ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división. ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud. ☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
ALICIA LLOREDA RICAURTE	
Nombre y apellidos	Representante Apoderado
C.C. 39.690.713 de Usaquén	53.215
Identificación	Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 006970

Bogotá D.C., Enero 20 de 2015 - 16:35:16

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	5869	20/01/2015		8.042.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5871	20/01/2015		476.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5873	20/01/2015		23.686.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO

Vr.CONCEPTO

1 50005-01-01 SOLICITUDES

2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE
DE INVENCIÓN CONT. DERE

478.000.00

478.000.00

\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-195499-00019-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-016117-00000-0000

Fecha: 2015-01-27 16:26:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 21 de 2015 - 07:43:41

Dependencia Jerárquica: Del. propiedad Industrial		Código: 2000
Dependencia Productora: G. nuevas creaciones		Código: 2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		
DESCRIPCION DE LA PRUEBA		
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:
Expediente: 12-195499-19 15-016117-0	Solicitante / Quejoso / Demandante / otros.	
Prueba excluida: CD		
N°. de Pruebas excluidas: 1		
Fecha de emisión de la Prueba:		
UBICACION DE LA PRUEBA EN LA SECCION DE MATERIAL GRAFICO		
N°. de bloque:		Otras especificaciones:
N°. de rodante:		
N°. de estante:		
N°. de archivador:		
N°. de entropaño:		
N°. de gaveta:		
N°. de caja:		
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.		
Observaciones: El CD contiene: 6 Archivos Pdf los cuales son procesados y subidos al Sistema		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro

PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF- α

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Proteínas de unión aisladas, por ejemplo, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), por ejemplo, al TNF- α humano. Composiciones basadas en anticuerpos. Moléculas relacionadas. Composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos. Métodos terapéuticos y de diagnóstico donde se emplean dichos anticuerpos.

SECTOR: Industria farmacéutica, preparaciones médicas compuestas por anticuerpos para métodos de tratamiento y diagnóstico.

PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF- α

REFERENCIA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisoria de los EEUU N° 61/321633, presentada el 7 de Abril de 2010, que se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para cualquier propósito.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con proteínas que se unen al TNF- α y con 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 DE LA INVENCION

En la técnica existe la necesidad de anticuerpos mejorados que puedan unirse al TNF- α (que también se conoce como factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral-alfa, factor de necrosis tumoral- α , TNF y caquectina). En una forma de realización, los anticuerpos pueden neutralizar el TNF- α . En la presente invención se provee una nueva familia de proteínas de unión, anticuerpos con CDR injertadas, anticuerpos humanizados y fragmentos de éstos que pueden unirse al TNF- α , que se unen al TNF- α con una afinidad elevada y que se unen al TNF- α y lo neutralizan.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con proteínas que se unen al TNF- α , particularmente con anticuerpos anti-TNF- α o porciones de unión al antígeno de éstos que se unen al TNF- α . En una forma de realización, el anticuerpo o la

porción de unión al antígeno de éste que pueden unirse al TNF- α comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 22-36.

En un aspecto, en la invención se provee una proteína de unión humanizada que comprende un dominio de unión al antígeno que puede unirse al TNF- α humano, donde el dominio de unión al antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos 31-35 de SEQ ID N° 22, los residuos 50-65 de SEQ ID N° 22, los residuos 98-106 de SEQ ID N° 22, los residuos 24-34 de SEQ ID N° 23, los residuos 50-56 de SEQ ID N° 23 y los residuos 89-97 de SEQ ID N° 23, donde la proteína de unión comprende un marco de trabajo aceptor humano. En una forma de realización, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR, por ejemplo, comprende un conjunto de CDR de dominios variables seleccionado del grupo que consiste en (a) los residuos 31-35 de SEQ ID N° 22, los residuos 50-65 de SEQ ID N° 22 y los residuos 98-106 de SEQ ID N° 22; y (b) los residuos 24-34 de SEQ ID N° 23, los residuos 50-56 de SEQ ID N° 23 y los residuos 89-97 de SEQ ID N° 23. En formas de realización particulares, el dominio de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 31-35 de SEQ ID N° 22, los residuos 50-65 de SEQ ID N° 22, los residuos 98-106 de SEQ ID N° 22, los residuos 24-34 de SEQ ID N° 23, los residuos 50-56 de SEQ ID N° 23 y los residuos 89-97 de SEQ ID N° 23.

En una forma de realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región VH, por ejemplo, una que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 24, 25, 28, 29,

30, 31, 32 y 33. En otra forma de realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región VL, por ejemplo, una que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 26, 27, 34, 35 y 36. En una forma de realización particular, el dominio de unión al antígeno comprende una región VH y una región VL, por ejemplo, donde la región VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 y la región VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 26, 27, 34, 35 y 36.

En una forma de realización, el marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 6-21. En una forma de realización particular, el marco de trabajo aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ IN N° 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 y 21. En otra forma de realización, el 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 65% idéntica a la secuencia del marco de trabajo aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a los del marco de trabajo aceptor humano. En otra forma de realización, el marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región del marco de trabajo, en un residuo fundamental, donde el residuo fundamental se selecciona del grupo que consiste en un residuo adyacente a una CDR, un residuo de un sitio de glicosilación, un residuo raro, un residuo que puede interactuar con el TNF- α humano, un residuo que puede 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 o un residuo en una región superpuesta entre la CDR1 de la cadena pesada variable definida por Chotia y el marco de trabajo de la primera cadena pesada definido por Kabat. En una forma de realización, el residuo fundamental se selecciona del grupo que consiste en H1, H12, H24, H27, H29, H37, H48, H49, H67, H71, H73, H76, H78, L13, L43, L58, L70 y L80. En una forma de realización, la mutación en la VH se selecciona del grupo que consiste en Q1E, I12V, A24V, G27F, I29L, V29F, F29L, I37V, I48L, V48L, S49G, V67L, F67L, V71K, R71K, T73N, N76S, L78I y F78I. En otra forma de realización, la mutación en la VL se selecciona del grupo que consiste en V13L, A43S, I58V, E70D y S80P. En una forma de realización, la proteína de unión comprende dos dominios variables, donde los dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27.

En una forma de realización, la proteína de unión se une al TNF- α . En otra forma de realización, la proteína de unión modula una función biológica del TNF- α . En otra forma de realización, la proteína de unión neutraliza el TNF- α . En aun otra forma de realización, la proteína de unión disminuye la capacidad del TNF-de unirse a su receptor., por ejemplo, la proteína de unión disminuye la capacidad del pro-TNF- α humano, del TNF- α humano maduro o de un TNF- α humano truncado de unirse a su receptor. En aun otra forma de realización, la proteína de unión reduce una o más actividades biológicas del TNF- α seleccionadas del grupo que consiste en la producción de citoquinas

dependiente del TNF, la exterminación de células dependiente del TNF, la inflamación dependiente del TNF, la erosión ósea dependiente del TNF y/o el daño en los cartílagos dependiente del TNF.

En una forma de realización, la proteína de unión tiene una constante de asociación (K_{on}) seleccionada del grupo que consiste en 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; y al menos $10^6 M^{-1} s^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial. En otra forma de realización, la proteína de unión tiene una constante de disociación (K_{off}) seleccionado del grupo que consiste en a lo sumo $10^{-3} s^{-1}$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-4} s^{-1}$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-5} s^{-1}$ aproximadamente; y a lo sumo $10^{-6} s^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial. En aun otra forma de realización, la proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M, y a lo sumo 10^{-13} M.

En una forma de realización, la proteína de unión comprende un dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de la IgM humana, un dominio constante de la IgG1 humana, un dominio constante de la IgG2 humana, un dominio constante de la Ig3 humana, un dominio constante de la IgG4 humana, un dominio constante de la IgGA humana y un dominio constante de la IgE humana. En una forma de realización particular, la región constante del dominio

de la cadena pesada de la inmunoglobulina es un dominio constante de la IgG1 humana. En otra forma de realización, la proteína de unión también comprende un dominio constante de la cadena liviana de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de la Ig kappa humana y un dominio constante de la Ig lambda humana. Por ejemplo, en una forma de realización, el dominio de unión comprende un dominio constante de la inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5. En una forma de realización particular, el dominio constante de la IgG1 humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3. En otra forma de realización, la región constante del dominio de la cadena liviana de la inmunoglobulina es un dominio constante de la Ig kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 4. En aun otra forma de realización, la región constante del dominio de la cadena liviana de la inmunoglobulina es un dominio constante de la Ig lambda humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 5.

En una forma de realización particular, en la invención se provee una proteína de unión que puede unirse al TNF- α humano, donde la proteína de unión comprende una región constante pesada de la Ig que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3; una región constante liviana de la Ig que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5; una región variable pesada de la Ig que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 24, 25, 28, 29,

30, 31, 32, y 33; y una región variable liviana de la Ig que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 26, 27, 34, 35, y 36. En una forma de realización particular, la proteína de unión de la invención se selecciona del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina, un fragmento Fv, un fragmento Fv con enlaces 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, un fragmento Fab', un anticuerpo biespecífico, un fragmento F(ab')₂, una DVD-Ig™, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región de la bisagra, un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada o un anticuerpo de cadena simple.

En otro aspecto, en la invención se provee una proteína de unión cristalizada que comprende una proteína de unión de la invención, donde la proteína de unión toma la forma de un cristal. En una forma de realización, el cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículos. En otra forma de realización, la proteína de unión tiene una vida media *in vivo* más prolongada que su contraparte soluble. En otra forma de realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica.

En otro aspecto, en la invención se provee una composición para liberar una proteína que se une al TNF- α , donde la composición comprende (a) una formulación, donde la formulación comprende una proteína de unión

cristalizada de la invención y un ingrediente; y (b) al menos un vehículo polimérico. En una forma de realización, el vehículo polimérico es un polímero que se selecciona entre uno o más de los siguientes: el ácido poli acrílico, el poli cianoacrilato, un poli aminoácido, un poli anhídrido, un poli depsipéptido, un poli éster, el poli ácido láctico, el ácido poli láctico-co-glicólico, el poli b-hidroxibutirato, la poli caprolactona, la poli dioxanona, el poli etilenglicol, la poli hidroxipropil metacrilamida, el poli organofosfazeno, los poli orto ésteres, el alcohol poli vinílico, la poli vinilpirrolidona, los copolímeros de anhídrido maleico-éter alquil vinílico, los polioles Pluronic, la albúmina, el alginato, la celulosa y sus derivados, el colágeno, la fibrina, la gelatina, el ácido hialurónico, los oligosacáridos, los glicaminoglicanos, los polisacáridos sulfatados y las mezclas y los copolímeros de éstos. En otra forma de realización, el ingrediente se selecciona del grupo que consiste en la albúmina, la sacarosa, la trehalosa, el lactitol, la gelatina, la hidroxipropil- β -ciclodextrina, el metoxipolietilenglicol y el polietilenglicol.

En otro aspecto, en la invención se provee una construcción con una proteína que puede unirse al TNF- α , que comprende una proteína que se une al TNF- α de la invención y un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un conector o un dominio constante de inmunoglobulina. En una forma de realización, la proteína de unión presenta un patrón de glicosilación humano. En otra forma de realización, la construcción con la proteína de unión es una construcción con una proteína que puede unirse al TNF- α cristalizada. En aun otra forma de realización, la construcción con una proteína que puede unirse al TNF- α cristalizada es una construcción farmacéutica de liberación controlada, que comprende una proteína que puede unirse al TNF- α cristalizada y que está

libre de vehículos. En una forma de realización particular, la construcción con una proteína que puede unirse al TNF- α tiene una vida media *in vivo* más prolongada que su contraparte soluble. En otra forma de realización, la construcción con la proteína de unión conserva su actividad biológica.

En otro aspecto, en la invención se provee un conjugado con una proteína que puede unirse al TNF- α , que comprende una construcción con una proteína que puede unirse al TNF- α de la invención y que también comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico o un agente citotóxico. En una forma de realización, el agente es un agente para el diagnóstico por imágenes que se selecciona del grupo que consiste en una marca radioactiva, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética y biotina. En una forma de realización, el agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm . En otra forma de realización, el agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

En otro aspecto, en la invención se provee un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión de la invención. En otro aspecto, en la invención se provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado de la invención. En una forma de realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ. En una forma de realización, en

la invención se provee una célula huésped que comprende un vector de la invención. En otra forma de realización, la célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En otra forma de realización, la célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula protista, una célula animal, una célula vegetal o una célula fúngica. En otra forma de realización, la célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto. Por ejemplo, la célula huésped es una célula CHO, una célula COS, una célula de levadura, por ejemplo, una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o una célula de insecto Sf9.

En otro aspecto, en la invención se provee un método para producir una proteína que se une al TNF- α , donde el método comprende los pasos de cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión que se une al TNF- α . También se provee una proteína que se une al TNF- α producida con este método.

En otro aspecto, en la invención se provee una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable opera como un coadyuvante útil para incrementar la absorción o la dispersión de la proteína de unión. En otra forma de realización, el coadyuvante es la hialuronidasa. En otra forma de realización, la composición farmacéutica también comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que actividad del TNF- α es perjudicial, por ejemplo, un agente terapéutico, un agente para el diagnóstico

por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasas, un bloqueador de moléculas de co-estimulación, un bloqueador de moléculas de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, el metotrexato, la ciclosporina, la rapamicina, FK506, una marca o un indicador, un antagonista del TNF- α , un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroideal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador 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 citoquinas.

En otro aspecto, en la invención se provee un método para tratar un mamífero, que comprende el paso de administrarle a dicho mamífero una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. En otra forma de realización, en la invención se provee un método para reducir la actividad del TNF- α humano, donde el método comprende el paso de poner en contacto el TNF- α humano con la proteína de unión de la invención, de manera tal de reducir la actividad del TNF- α humano. En otra forma de realización, en la invención se provee un método para reducir la actividad del TNF- α humano en un sujeto humano que sufre un trastorno en el que la actividad del TNF- α es perjudicial, donde el método comprende el paso de administrarle al sujeto humano una proteína de unión de la invención, con el propósito de reducir la

actividad del TNF- α humano en dicho sujeto. En otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar una enfermedad o un trastorno en el que actividad del TNF- α es perjudicial en un sujeto, donde el método comprende el paso de administrarle al sujeto una proteína de unión de la invención, con el propósito de efectuar el tratamiento.

En otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar un paciente que sufre un trastorno en el que el TNF- α es perjudicial, que comprende el paso de administrar una proteína de unión de la invención antes de la administración de un segundo agente, de manera concurrente con él o después de él, donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, o un fragmento de éste, que puede unirse a la IL-12 humana, PGE2, LPA, NGF, CGRP, SubP, RAGE, la histamina, un bloqueador de los receptores de histamina, la bradiquinina, la IL-1 α , la IL-1 β , el VEGF, el PLGF, el metotrexato, un corticosteroide, un modulador de los receptores de glucocorticoides, la ciclosporina, la rapamicina, FK506, un agente anti-inflamatorio no esteroide y la esclerostina. En una forma de realización, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno respiratorio, el asma, el asma alérgico o no alérgico, el asma debido a infecciones, el asma debido a una infección del virus sincicial respiratorio (RSV), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), una afección relacionada con la inflamación de las vías aéreas, la eosinofilia, la fibrosis o la producción excesiva de mucus, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar, un trastorno atópico, 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, la

enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la afección inflamatoria y/o autoinmune del hígado, la cirrosis hepática, la fibrosis hepática, la fibrosis hepática provocada por el 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, una infección viral, una infección bacteriana, una infección parasitaria, una infección del HTLV-1, la supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras tipo 1 o la supresión de la expresión de las respuestas inmunes protectoras tipo 1 durante la vacunación. En una forma de realización, el trastorno se selecciona entre los siguientes: artritis reumática, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio,

enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliácea, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémicas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumática, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis

anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad al espermatozoide, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumática, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por

drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, aguda y procesos parasitarios o infecciosos crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardíacas, síndrome de *atontamiento* cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al trasplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo

crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano o tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallervorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad,

hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, toxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumática juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y ramas de ésta, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares

periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía neumocistitis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsums, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumática juvenil de comienzo sistémico, células T o FAB ALL, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome Wernicke-Korsakoff, síndrome Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos,

polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatrizal, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev; trastorno neuronal motor, penfigoide de la

membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad del corazón reumático, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), esclerodermia, amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas, yersinia y artropatía asociada con salmonella.

En otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar un paciente que sufre un trastorno en el que el TNF- α es perjudicial,

donde el método comprende el paso de administrar una proteína de unión de la invención antes de la administración de un segundo agente, de manera concurrente con él o después de él, donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un esteroide inhalable, un beta-agonista, un beta-agonista de acción breve o prolongada, un antagonista del leucotrieno o de los receptores de leucotrieno, ADVAIR, un inhibidor de la IgE, un anticuerpo anti-IgE, XOLAIR, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un inhibidor de la PDE4, la xantina, una droga anticolinérgica, un agente estabilizador de los mastocitos, la cromolina, un inhibidor de la IL-4, un inhibidor de la IL-5, la eotaxina/CCR3, un inhibidor de la histamina o de sus receptores, incluyendo H1, H2, H3 y H4, un antagonista de la prostaglandina D o de sus receptores DP1 y CRTH2, un antagonista del TNF, un fragmento soluble de un receptor del TNF, ENBREL, un antagonista enzimático del TNF, un inhibidor de la enzima convertidora del TNF (TACE), un antagonista de los receptores muscarínicos, un antagonista del TGF-beta, el interferón gamma, la perfenidona, un agente quimioterapéutico, el metotrexato, la leflunomida, el sirolimus (rapamicina) o un análogo de éste, CCI-779, un inhibidor de COX2 o de cPLA2, una NSAID, un inmunomodulador, un inhibidor de p38, TPL-2, un inhibidor de MK-2 y NFkB, la budenosida, el factor de crecimiento epidérmico, un corticosteroide, la ciclosporina, la sulfasalazina, el aminosalicilato, la 6-mercaptopurina, la azatioprina, el metronidazol, un inhibidor de la lipoxigenasa, la mesalamina, la olsalazina, la balsalazida, un antioxidante, un inhibidor del tromboxano, un antagonista de los receptores de IL-1, un anticuerpo anti-IL-1 β , un anticuerpo anti-IL-6, un factor de crecimiento, un inhibidor de la elastasa, un compuesto de piridinil-imidazol, un anticuerpo contra la LT, la IL-1, la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-

5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-9, la IL-10, la IL-11, la IL-12, la IL-14, la IL-15, la IL-16, la IL-17, la IL-18, la IL-19, la IL-20, la IL-21, la IL-22, la IL-23, la IL-24, la IL-25, la IL-26, la IL-27, la IL-28, la IL-29, la IL-30, la IL-31, la IL-32, la IL-33, la EMAP-II, el GM-CSF, el FGF o el PDGF, o un agonista de éstos, un anticuerpo contra CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, FK506, la rapamicina, el mofetil micofenolato, el ibuprofeno, la prednisolona, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un agonista de la adenosina, un agente antitrombótico, un inhibidor del complemento, un agente adrenérgico, un inhibidor de una quinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP, un inhibidor de la enzima convertidora de IL-1 β , un inhibidor de la enzima convertidora de TNF- α , un inhibidor de la señalización de las células T, un inhibidor de metaloproteinasas, la 6-mercaptopurina, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un receptor de citoquinas soluble, un receptor del TNF p55 soluble, un receptor del TNF p57 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, una citoquina anti-inflamatoria, la IL-4, la IL-10, la IL-11 y el TGF- β .

En una forma de realización, la proteína de unión de la invención se administra en el sujeto a través de una vía seleccionada del grupo que consiste parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intraventricular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con proteínas que se unen al TNF- α , particularmente con anticuerpos anti-TNF- α o porciones de unión al antígeno de éstos que se unen al TNF- α (es decir, el factor de necrosis tumoral, el factor de necrosis tumoral-alfa, el factor de necrosis tumoral- α , el TNF o la caquectina). Diversos aspectos de la invención 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. Dentro del alcance de la invención también se contemplan métodos para usar los anticuerpos de la invención para detectar el TNF- α humano, para inhibir el TNF- α humano in vitro o in vivo y para regular la expresión del gen del TNF- α o las funciones relacionadas con él. También se describen composiciones que comprenden los anticuerpos de la presente invención, así como métodos para usar dichos anticuerpos.

A menos que se los defina de otro modo en la presente documentación, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tienen los significados que comúnmente les dan aquellos versados en la técnica. El significado y el alcance de los términos debería estar claro; 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 pluralidades, y los términos plurales incluirán las formas singulares. En esta solicitud, el uso de “o” denota “y/o”, a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término “incluyendo”, así

como otras formas del término, tales como “incluye” e “incluido”, no es limitativo. 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.

En general, las nomenclaturas usadas en conexión el cultivo de células y tejidos, la patología, la oncología, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química y la hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Los métodos y los procedimientos de la presente invención generalmente se llevan a cabo 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 esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se los lleva a cabo en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las nomenclaturas usadas en conexión con los procedimientos de laboratorio y los procesos de química analítica, la química de síntesis orgánica y la química farmacéutica descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, las preparaciones farmacéuticas, la formulación, la administración y el tratamiento de los pacientes.

Para que la presente invención se comprenda con mayor facilidad, a continuación se definen determinados términos selectos.

El término “polipéptido” hace referencia a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos “péptido” y “proteína” se usan indistintamente con el término polipéptido, y también hacen referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término “polipéptido” abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos 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, en virtud de su origen o la fuente de la que deriva, no está asociado con los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo; se halla sustancialmente libre de otras proteínas 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 se abrevia en la presente como hTNF- α) incluye una proteína citoquina trimérica. El término incluye una proteína homotrimérica que comprende tres proteínas del TNF- α de 17,5 kD. La proteína homotrimérica se conoce como “proteína del TNF- α ”. El término “TNF- α ” ha de incluir el TNF- α humano recombinante (rhTNF- α), que puede prepararse 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
		12345678901234567890123456789012
TNF- α humano	SEQ ID N° 1	VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNDR ANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLF KGQGCPSHTVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSA IKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEK GDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL

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

Los términos “unión específica” o “unirse específicamente”, con relación a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, denotan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un epítopo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en vez de a las 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 “anticuerpo” hace referencia ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig), o a cualquier porción de unión al antígeno de ésta, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o a cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivado de ésta, que retenga las características esenciales de unión a epítopes de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica. A continuación se describirán formas de realización 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 documentación) 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 documentación) 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” o “región de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción 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, el 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 tienen 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), 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 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 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término “anticuerpo construido”, hace referencia a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención, 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 o liviana. 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	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante mutante de Ig gamma-1	SEQ ID N° 3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante de Kappa Ig	SEQ ID N° 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Región constante de Lambda Ig	SEQ ID N° 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo 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) *Hum. Antibod. Hybridomas* 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 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 anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente documentación.

Un “anticuerpo aislado”, hace referencia a un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, 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 de hTNF- 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” abarca los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de éstos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención 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, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, los anticuerpos aislados de una biblioteca de combinación de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70; Azzazy y Highsmith (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo y Larrick (2000) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom y Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) transgénico para genes de inmunoglobulina humanos (véanse, por ejemplo, Taylor et al. (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, o a porciones de unión al antígeno del mismo, 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 injerto de CDR” hace referencia a un anticuerpos o una porción de unión al antígeno de éste que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena liviana de una especie, pero donde las secuencias de una o más de las regiones CDR de la VH y/o de la VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otras especies, tales como anticuerpos con secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena liviana humana donde una o más de las CDR humanas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR murinas.

El término “anticuerpo humanizado” hace referencia a anticuerpos, o a porciones de unión al antígeno del mismo, 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, en el que se han introducido secuencias CDR no humanas en los marcos de trabajo de la VH y la VL humanas.

Los términos “numeración de Kabat”, “definiciones de Kabat” y “nomenclatura de Kabat” se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, 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 Protins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Véase también, Martin, “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains” en Kontermann y Dübel, editores Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlín, 2001), capítulo 31, especialmente las páginas 432-433. Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre los aminoácidos 31 y 35 para CDR1, entre los aminoácidos 50 y 65 para CDR2 y entre los aminoácidos 95 y 106 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.

Los términos “acceptor” y “anticuerpo acceptor” hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 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 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 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 “CDR” hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las secuencias variables 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 a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable y permiten la 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., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) 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 y colegas (Chotia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917) y Chotia et al. (1989) *Nature* 342:877-883) descubrieron que determinadas sub-porciones en las CDR de Kabat adoptan conformaciones prácticamente idénticas en el esqueleto peptídico, a pesar de poseer una gran diversidad a nivel de la secuencia 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. Se han descrito otras CDR que definen límites superpuestas con las CDR de Kabat en Padlan (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 acordes con ninguno de los sistemas anteriores, pero aun así podrán superponerse con las CDR de Kabat, aunque podrán ser más cortas o más largas, debido a la predicción o los descubrimientos experimentales de que determinados residuos particulares o grupos de

residuos, o incluso CDR completas, 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 formas de realización particulares se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

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.* 196:901-917; Chotia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817. 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.

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

Tabla 3. Secuencias aceptoras de la cadena pesada

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
SEQ ID N° 6	VH4-59 FR1	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISS
SEQ ID N° 7	VH4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
SEQ ID N° 8	VH4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
SEQ ID N° 9	VH3-53 FR1	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSS
SEQ ID N° 10	VH3-53 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
SEQ ID N° 11	VH3-53 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
SEQ ID N° 12	JH1/JH4/JH5 FR4	WGQGTLLVTVSS
SEQ ID N° 13	JH2 FR4	WGRGTLVTVSS
SEQ ID N° 14	JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

Tabla 4. Secuenciasceptoras de la cadena liviana

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
SEQ ID N° 15	1-39/O12 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
SEQ ID N° 16	1-39/O12 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
SEQ ID N° 17	1-39/O12 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
SEQ ID N° 18	3-15/L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
SEQ ID N° 19	3-15/L2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
SEQ ID N° 20	3-15/L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
SEQ ID N° 21	JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

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. (véase, por ejemplo., Shapiro et al. (2002) *Crit. Rev. Immunol.* 22(3):183-200; Marchalonis et al. (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* 484:13-30). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas formas de realización de la presente invención 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 fundamental incluye, sin limitaciones, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (por ejemplo, un sitio de glicosilación N u O), 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 dentro de la zona de Vernier y un residuo en la región superpuesta entre la definición de Chotia de una CDR1 variable de la cadena pesada y la definición de Kabat del primer marco de trabajo de la cadena pesada.

El término “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 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 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 particular, 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, por ejemplo, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitaciones, por ejemplo, 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 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 forma de realización particular, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, y al menos 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). 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 de Vernier” hace referencia a un subconjunto de residuos del marco de trabajo que pueden ajustar la estructura de la CDR y optimizarla para que se una al antígeno, como se describe en Foote y Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499. Los residuos de la zona de Vernier forman una capa 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. La proteína de unión multivalente puede diseñarse para que tenga tres o más sitios de unión a 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 o las inmunoglobulinas con dos dominios variables (DVD-Ig), como se las usa

en la presente, hacen referencia a proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno, por lo que son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Estas DVD-Ig pueden ser monoespecíficas, es decir, pueden ser capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, es decir, pueden ser capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD-Ig que comprenden dos polipéptidos DVD-Ig de cadena pesada y dos polipéptidos DVD-Ig de cadena liviana se conocen como una Ig DVD-Ig. Cada mitad de una DVD-Ig comprende un polipéptido DVD-Ig de cadena pesada, y un polipéptido DVD-Ig 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 elaborarlas se describen en la Patente de los EEUU N° 7612181.

Un aspecto de la invención se relaciona con una proteína de unión DVD que comprende proteínas que pueden unirse al TNF- α . En una forma de realización particular, 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 particular, una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador cuya unión al hTNF- α resulta en la inhibición de una actividad biológica del hTNF- α , por ejemplo, la proteína de unión neutralizadora se une al hTNF- α y reduce una actividad biológica del hTNF- α al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de una actividad biológica de hTNF- α por una

proteína de unión neutralizadora puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica hTNF- α bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la neutralización de la citotoxicidad del TNF- α en células L929.

En otra forma de realización, el término “agonizar” hace referencia a un incremento de una actividad biológica de TNF- α cuando una proteína de unión se une específicamente al TNF- α , por ejemplo, el hTNF- α . En una forma de realización particular, una proteína de unión agonista es un anticuerpo agonista cuya unión al TNF- α resulta en el incremento de una actividad biológica del TNF- α . En una forma de realización particular, la proteína de unión agonista se une al TNF- α e incrementa una actividad biológica del TNF- α al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. La inhibición de una actividad biológica del TNF- α por una proteína de unión agonista puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica hTNF- α bien conocidos en la técnica.

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

Los términos “epitope” y “determinante antigénico” hacen referencia a un sitio en un antígeno al que se une una inmunoglobulina, por ejemplo, un anticuerpo, o al que se une un receptor de las células T. 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. 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. Los epítopes pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos, o bien mediante un pliegue terciario de una proteína. Los epítopes formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se conservan al exponerse a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopes formados a partir de un pliegue terciario típicamente se pierden al realizar un tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos con una conformación espacial única. Los métodos para determinar qué epítopes se unen a un anticuerpo dado (es decir, el mapeo de epítopes) son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los ensayos de inmunotransferencia y de inmunoprecipitación, donde se evalúa la reactividad de péptidos superpuestos o contiguos del TNF- α con un anticuerpo anti-TNF- α determinado. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopes incluyen procedimientos conocidos en la técnica y los métodos que se describen en la presente, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, editor (1996)).

Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los anticuerpos que se unen a un epítopo en el TNF- α que comprende la totalidad o una porción de un epítopo que es reconocido por los anticuerpos particulares que se describen en la presente (por ejemplo, una región idéntica o superpuesta, una región intermedia o una región que abarca las anteriores).

Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los anticuerpos que se unen a un mismo epítopo y/o los anticuerpos que compiten por la unión al TNF- α , por ejemplo, el TNF- α humano, con los anticuerpos que se describen en la presente. Los anticuerpos que reconocen un mismo epítopo o que compiten por la unión pueden identificarse usando técnicas de rutina. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, con el que puede demostrarse la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno blanco, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se desea evaluar inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como el hTNF- α . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, el inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, el ensayo de competición en sándwich (véase Stahl et al. (1983) *Methods in Enzymol.* 9:242), el EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (véase Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614), un ensayo con una marca en fase sólida, un ensayo directo en sándwich con una marca en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)), un RIA directo con una marca de I-125 en fase sólida (véase Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7), el EIA directo en fase sólida

con biotina-avidina (Cheung et al. (1990) *Virol.* 176:546) y un RIA directo con una marca (Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77). Típicamente, este ensayo comprende el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando haya un anticuerpo competitivo presente en exceso, éste inhibirá la unión específica del anticuerpo referencia a un antígeno común al menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, los métodos de mapeo de epitopes, tales como los análisis de ratos X de complejos de antígenos y anticuerpos, con los que puede obtenerse la resolución atómica del epitope. En otros métodos, se monitorea la unión del anticuerpo a fragmentos del antígeno o a variaciones mutadas del antígeno, donde la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácido en la secuencia del antígeno frecuentemente se considera indicativa de un componente que es un epitope. Para mapear los epitopes también pueden usarse métodos de combinación informática. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés de aislar por afinidad péptidos cortos específicos a partir de bibliotecas de péptidos combinados presentados en fagos. Los péptidos se consideran referencias para definir el epitope que corresponde al anticuerpo que se usa para analizar la biblioteca de proteínas. Para el mapeo de epitopes, también se

han desarrollado algoritmos informáticos que permiten mapear los epitopes con conformaciones discontinuas.

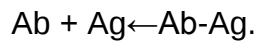
El término “resonancia de plasmón superficial” hace referencia a un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (biosensor Pharmacia AB, 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 asociación 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 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 siguiente ecuación:



El término “ K_{off} ” hace referencia a la constante de disociación para la disociación, o la “constante de la velocidad de disociación”, de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. Este valor representa la

constante de disociación de un anticuerpo de su antígeno blanco, o la separación del complejo Ab-Ag en el transcurso del tiempo, lo que resulta en el anticuerpo y el antígeno libres, como se ilustra en la siguiente ecuación:



El término “ K_D ” hace referencia a la “constante de disociación en equilibrio” y representa el valor que se obtiene en una medición de la titulación en equilibrio, o bien dividiendo la constante de disociación (k_{off}) por la constante de asociación (k_{on}). La constante de asociación, la constante 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 velocidad de asociación y disociación 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 Sapidyne 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 particular, 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 radionucleidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho ó ^{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 particular, 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, daunorrubicina, 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 la técnica. 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 Giegé et al., capítulo 1, en Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach, 2ª edición, (Ducruix y Giegé, editores) (Oxford University Press, Nueva York, 1999), pp. 1-16.

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

El término “polinucleótido aislado” hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, genómico, de ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de éstos) que, en virtud de su origen, no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que normalmente se halla asociado en la naturaleza; que está unido operativamente a un polinucleótido con el que

normalmente no se halla unido en la naturaleza; o que no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

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 en forma operativa. 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, la invención pretende 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 "unido operativamente" hace referencia a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están relacionados de tal manera que pueden funcionar de la manera pretendida. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está unida de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen 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. 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” hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariotas o eucariotas. 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 particular, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y

animales. En una realización particular, 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, 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 documentación. Las técnicas y los procedimientos mencionados en general pueden llevarse a cabo 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 presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

“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 hacen referencia 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 la Publicación PCT Internacional WO 01/83525.

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

de TNF- α , o proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o cualquier otra molécula que se una a TNF- 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 los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del TNF- α , por ejemplo, el hTNF- α . Los antagonistas y los inhibidores del hTNF- α pueden incluir, sin limitaciones, las proteínas, los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono o cualquier otra molécula que se une al 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” se usa en la presente en su sentido más amplio. Una “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 de la presente invención, se proveen anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α con gran afinidad, que presentan una disociación lenta y una gran capacidad de neutralización. En un segundo aspecto de la invención, se proveen anticuerpos quiméricos que se unen al TNF- α . En un tercer aspecto de la invención, se proveen anticuerpos con CDR injertadas, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α . En un cuarto aspecto de la invención, se proveen anticuerpos humanizados, o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al TNF- α . En una forma de realización particular, los anticuerpos, o las porciones de éstos, son anticuerpos aislados. En una forma de realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizadores anti-TNF- α humano o anticuerpos que modulan las funciones del TNF- α .

A. Métodos para obtener anticuerpos anti-TNF- α

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

1. 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., editores, “Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas” en *Research Monographs in Immunology*, vol. 3 (J.L. Turk, editor general) (Elsevier, Nueva York, 1981), pp. 563-587. 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, en la presente invención 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 de la invención, donde el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención 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 de la invención. En resumen, pueden inmunizarse ratones con un antígeno del TNF- α . En una realización particular, 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 particular, 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 de 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 se puede usar 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 de 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 la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por medio de una dilución limitada. Después, los clones de hibridomas se evalúan con métodos conocidos en la técnica para determinar si hay células que secreten anticuerpos capaces de unirse a TNF- α . Es posible generar fluido de ascites, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, inmunizando los ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra 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 realización particular, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea de células no secretoras). Después de realizar la fusión y la selección con antibióticos, los hibridomas se analizan usando el TNF- α , una porción de éste o una célula donde se expresa el TNF- α . En una forma de realización particular, el análisis inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ELISA. Se provee un ejemplo de un análisis de ELISA en la Publicación internacional PCT WO 00/37504.

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 singénicos, 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 aquellos entrenados en la técnica.

En una realización particular, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió con anterioridad. En otra forma de realización particular, 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 de la invención 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. Producción de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α usando SLAM

En otro aspecto de la invención, 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 cualquiera de los animales inmunizados descritos en la sección 1, usando un ensayo en placas hemolíticas con especificidad por el antígeno, donde el antígeno de TNF- α , una subunidad de TNF- α o un fragmento de ésta, se une a eritrocitos de oveja usando un conector, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por TNF- α . Una vez identificadas las células que secretan los anticuerpos de interés, se rescatan moléculas de 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 mamíferos, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a análisis adicionales y a una selección posterior *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas células que expresen anticuerpos contra TNF- α . Además, las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse *in vitro*, tal como 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. Producción de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α usando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos se producen inmunizando un animal no humano que comprende algunos o todos los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno de TNF- α . En una realización particular, 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 WO 91/10741, publicada el 25 de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO

99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 00/09560, publicada el 24 de Febrero de 2000, y WO 00/37504, publicada el 29 de Junio 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio de anticuerpos completamente humanos similar al de un ser humano adulto y genera anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por antígenos determinados. 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, Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483-495.

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

También pueden usarse métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, 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° 5.223.409; publicaciones PCT 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. Acid Res.* 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, y publicación de Patente de los EEUU N° 2003.0186374.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto inmunizado con TNF- α , o con una porción de TNF- α . Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con TNF- α , tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con TNF- α humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan analizando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende TNF- α humana, con el fin de seleccionar aquellos anticuerpos que reconocen TNF- α . Los métodos para efectuar estos procedimientos de análisis y selección son bien conocidos en la técnica, y pueden hallarse en las referencias citadas en el párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares por TNF- α , tales como aquellos que se disocian de 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 de la invención 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, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o con una porción de unión a antígeno de éste que se une a TNF- α , por ejemplo,

TNF- α humana. En una realización particular, 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 de la presente invención 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 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 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 elaborar los anticuerpos de la presente invención 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, las publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047 (PCT Application N° PCT/GB91/01134), WO 92/18619, WO

93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401, así como las Patentes de los EEUU N° 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 y 5969108.

Como se describe en las referencias anteriores, 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 a 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 más adelante. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ de manera recombinante, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34; y Better et al. (1998) *Science* 240:1041-1043. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir fragmentos Fv y anticuerpos de cadena simple incluyen las 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. (1998) *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 de especificidad doble de acuerdo con la invención. 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 de la presente invención 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 al antígeno

expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levaduras que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Wittrup, et al., Patente de los EEUU N° 6699658 y Frenken et al., Patente de los EEUU N° 6114147.

B. Producción de anticuerpos recombinantes contra el TNF- α

Los anticuerpos de la presente invención 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 de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas se observa, por ejemplo, en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete un anticuerpo plegado correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas (y en particular, en células de mamíferos) que en las células eucariotas.

Las células huésped de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención 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, en particular, 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 la presente invención. 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 de esta invención. 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 de la invención. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales, donde una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo de la invención, 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 de la invención con un

segundo anticuerpo, de acuerdo con métodos de cruzamiento químico convencionales.

En un sistema ejemplificativo para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a 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 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. Adicionalmente, en la invención se provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado un anticuerpo recombinante de la invención. 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 región VL de los anticuerpos anti-hTNF- α de la invención (las secuencias de las CDR están en negrita).

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

SEQ ID NO.	Región proteica		Secuencia
			123456789012345678901234567890
22	VH MAK195		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT DYGVN WVRQPPGKGLEWLG MIWGDGSTDYD STLKS RLSISKDNSKSKQIFLKMNSLQTDDT ARYYCARE EWHHGPVAY WGQGTLVTVSA
	VH MAK195 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:22	DYGVN
	VH MAK195 CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NO:22	MIWGDGSTDYDSTLKS
	VH MAK195 CDR-H3	Residuos 98-106 de SEQ ID NO:22	EWHHGPVAY
23	VL MAK195		DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCK KASQAVS SAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVDP RFTGSGSVTDFTLTIHNLQAEDLALYYC QQ HYSTPFT FGSGTKLEIKR
	VL MAK195 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:23	KASQAVSSAVA
	VL MAK195 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:23	WASTRHT
	VL MAK195 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:23	QQHYSTPFT

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 con detalle en el Ejemplo 2.1. Véanse, por ejemplo, Morrison (1985) *Science* 229:1202; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214-221; Gillies et al. (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; las Patentes de los EEUU Nº 5807715, 4816567 y 4816397. Además, pueden usarse técnicas para producir “anticuerpos quiméricos” (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984), *Nature* 312:604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314:452-454) en las que se separan genes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad por el antígeno apropiado, para luego combinarlos con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada.

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

3. Anticuerpos anti-TNF- α con CDR injertadas

Los anticuerpos con CDR injertadas de la invención 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 de la invención. Una secuencia de la región del marco de trabajo 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 de trabajo humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Entonces, en una forma de realización, la región variable del marco humano seleccionada para reemplazar la región variable del marco murino, aparte de las CDR, tiene al menos a 65% de identidad de secuencia con la región variable del marco del anticuerpo murino. En una forma de realización particular, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tienen al menos 70% de identidad de secuencia. En una forma de realización particular, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tienen al menos 75% identidad de secuencia. En una forma de realización particular, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tienen al menos 80% identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se describen con detalle en el Ejemplo 2.2 (véanse también la Patente EP N° EP 0 239 400, la Publicación PCT WO 91/09967, las Patentes de los EEUU N° 5225539, 5530101 y 5585089). También puede recurrirse a modificaciones superficiales (EP 0 592 106, EP 0 519 596, Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498, Studnicka et al (1994) *Proteína Eng.* 7(6):805-814, Roguska et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973) y a la reorganización de las cadenas (Patente de los EEUU N° 5565352).

En una realización específica, en la invención 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
24	hMAK195VH.1z	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS DYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWGDGSTDYD STLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARE EWHHGPVAYWCQ GTLVTVSS
25	hMAK195VH.2z	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS DYGVNWVRQAPGKGLEWVSMIWGDGSTDYD STLKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARE EWHHGPVAYWCQ GTLVTVSS
26	hMAK195Vk.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCK KASQAVS SAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHT GVPS RFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC QQ HYSTPFT FGQGTKLEIK
27	hMAK195Vk.2z	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC KASQAVS SAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRHT GIPA RFGSGSGTEFTLTITSSLPQSEDFAVYYC QQ HYSTPFT FGQGTKLEIK

4. Anticuerpos anti-hTNF- α humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de la especie no humana, y regiones de marco 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.anticuerporesource.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/Anticuerpo.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.anticuerporesource.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/anticuerpo/;
www.m.ehimeu.ac.jp/.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; anticuerpo.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 of Proteins of 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 Nº 5.585.089; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327). Hay programas informáticos disponibles que permiten ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales de 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 Engineering.* 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 (la Solicitud internacional N° PCT/US98/16280), WO 97/20032 (Solicitud N° PCT/US96/18978), WO 92/11272 (Solicitud N° PCT/US91/09630), WO 92/03461 (Solicitud N° PCT/US91/05939), WO 94/18219 (Solicitud N° PCT/US94/01234), WO 92/01047 (Solicitud N° PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (Solicitud N° PCT/GB92/01755), WO 90/14443, WO 90/14424, y WO 90/14430, las Publicaciones Europeas N° EP 0 592 106, EP 0 519 596 y EP 0 239 400, las 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 de la presente invención presentan una capacidad elevada de reducir o neutralizar la actividad del TNF- α , lo cual puede evaluarse, por ejemplo, con cualquiera de los diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* que se conocen en la técnica. Como alternativa, los anticuerpos anti-TNF- α de la presente invención también presentan una capacidad elevada de incrementar o agonizar la actividad del TNF- α .

En formas de realización particulares, el anticuerpo aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a la TNF- α humana, en donde el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de la 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 la 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 del mismo, se puede disociar de la 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 la 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 del mismo, se puede disociar de la 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 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 del mismo, se puede disociar de la 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 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se puede disociar de la TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menos. Como alternativa, el anticuerpo,

o una porción de unión al antígeno del mismo, se puede disociar de la TNF- α humana con una constante de disociación k_{off} de aproximadamente 1×10^{-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. Aun más, 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 anticuerpo 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 (véase Patente de los EEUU N° 5.648.260 y 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo es mediadora de diferentes funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, la ADCC, la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por complemento (CDC), y la velocidad de eliminación/vida media de los anticuerpos y 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 FcγRs 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 anticuerpo de la invención ha sido derivatizado o unido a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención puede obtenerse por derivatización mediante la unión funcional de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención (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 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 una porción de anticuerpo de la invención, 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, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir 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 realización de la invención, se provee una proteína de unión cristalizada. En una realización, la invención se relaciona con cristales de anticuerpos completos anti-TNF- α , y fragmentos de los mismos, según se revela 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 de la invención pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos en la publicación PCT WO 02072636.

En forma de realización de la invención, se provee una proteína de unión glicosilada, donde el 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 postraduccional. 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 (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 en la invención pueden incluirse, sin limitaciones, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. 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 antígeno 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

Debido a su capacidad de unirse al TNF- α humano, por ejemplo, los anticuerpos anti-TNF- α humano de la invención, o las porciones de éstos, pueden usarse para detectar el TNF- α (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como el suero o el plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunohistoquímica tisular. En la invención se provee un método para detectar TNF- α humana en una muestra biológica, que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y detectar el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) unido a la TNF- α , o el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) no unido, para detectar de este modo la TNF- α en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Entre las sustancias detectables apropiadas se incluyen distintas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos apropiados de enzimas, se incluye la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupos prostéticos complejos

apropiados, se incluye la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados, se incluye la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamino fluoresceína, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y entre los ejemplos de materiales radioactivos apropiados, se incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

Como una alternativa de marcar el anticuerpo, la TNF- α humana puede ser evaluada en fluidos biológicos con un inmunoensayo de competencia utilizando estándares de TNF- α marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-TNF- α humana no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los estándares de rhTNF- α marcados y el anticuerpo anti-TNF- α humana y se determina la cantidad de estándar de rhTNF- α marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de TNF- α humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhTNF- α marcado unido al anticuerpo anti-TNF- α . De manera similar, el TNF- α humano también puede evaluarse en fluidos biológicos con un inmunoensayo competitivo, usando referencias de rhTNF- α marcado con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-TNF- α humano sin marcar.

En una forma de realización, los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad del TNF- α , por ejemplo, la actividad del TNF- α humano, tanto *in vitro* como *in vivo*. En otra forma de realización, los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden incrementar o agonizar la actividad del TNF- α , por ejemplo, la actividad del TNF- α humano. Por consiguiente, los anticuerpos y las

porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir o incrementar la actividad del hTNF- α , por ejemplo, en un cultivo celular que contiene hTNF- α , en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que poseen un TNF- α con el que puede reaccionar un anticuerpo de la invención. En una forma de realización, en la invención se provee un método para inhibir o incrementar la actividad del hTNF- α , que comprende poner en contacto el hTNF- α con un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, de manera tal de inhibir o incrementar la actividad del hTNF- α . Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene hTNF- α , o en un cultivo sospechado de contener hTNF- α , puede agregarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir o incrementar la actividad del hTNF- α .

En otra forma de realización, en la invención se provee un método para reducir o incrementar la actividad del hTNF- α en un sujeto, ventajosamente en un sujeto que sufre una enfermedad o un trastorno en el que actividad del TNF- α es perjudicial, o como alternativa, beneficiosa. En la invención se proveen métodos para reducir o aumentar la actividad de TNF- α en un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno tal, donde dicho método comprende administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención de modo tal que se reduce o aumenta la actividad de TNF- α en el sujeto. En una forma de realización particular, la TNF- α es la TNF- α humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero en el que se expresa un TNF- α al que puede unirse un anticuerpo de la invención. Aun más, el sujeto puede ser un mamífero en el cual se ha introducido TNF- α (por ejemplo, por administración de TNF- α o por expresión de un transgen de TNF- α). Es posible administrar un anticuerpo de la invención

a un sujeto humano con propósitos terapéuticos. Más aun, el anticuerpo de la invención puede ser administrado a un mamífero no humano que expresa una TNF- α con la cual el anticuerpo tiene capacidad de unirse con fines veterinarios o como un modelo de animales de la enfermedad humana. Con relación a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, evaluando las dosificaciones y la progresión de la administración en el tiempo).

El término “un trastorno donde la actividad de TNF- α es perjudicial” incluye enfermedades y otros trastornos donde se ha demostrado que la presencia de actividad de 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 de TNF- α es perjudicial es un trastorno donde se espera que la reducción de la actividad de TNF- α alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Estos trastornos pueden manifestarse, por ejemplo, a través de un incremento en la concentración del TNF- α en un fluido biológico del sujeto que sufre el trastorno (por ejemplo, un incremento en la concentración del TNF- α en el suero, el plasma o el fluido sinovial del sujeto, etcétera), que puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-TNF- α como los que se describieron con anterioridad. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior, relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Como alternativa, el término “un trastorno en el que actividad del TNF- α es beneficiosa” incluye las enfermedades y los trastornos donde se ha

demostrado o se sospecha que la presencia de actividad del TNF- α en los sujetos que los sufren es beneficiosa para tratar la patofisiología del trastorno, o bien es un factor que contribuye al tratamiento del trastorno. Por ende, un trastorno en el que actividad del TNF- α es beneficiosa es un trastorno en el que se espera que un incremento en la actividad del TNF- α alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior, relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

E. Composiciones farmacéuticas

En la invención también se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o una porción de unión de éste al antígeno de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para usar, sin limitaciones, en el diagnóstico, la detección o el monitoreo de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el manejo o el alivio de un trastorno, o uno o más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención, y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para tratar un trastorno donde la actividad de TNF- α es perjudicial. En una forma de realización particular, 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.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración a un sujeto. En general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Un “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 farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución amortiguadora salina con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, en la composición se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo o una porción de anticuerpo.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico de utilidad para prevenir, manejar, tratar o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, 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 de la invención incluyen, sin limitaciones, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración por la mucosa (por ejemplo, las rutas intranasal y oral). Además, se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente para una aplicación en aerosol. Véase por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 y 5290540 y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia combinada o una composición de la invención usando la tecnología de liberación pulmonar de drogas Alquerme AIR® (Alquerme, Inc., Cambridge, Mass.). En una forma de realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. 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 de la invención localmente en el área que necesita del tratamiento; esto puede efectuarse, por ejemplo, y sin limitaciones, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, donde dicho implante es 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 de la invención antagonistas localmente en el área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención 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 un anticuerpo de la invención 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 administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una forma de realización, puede usarse una bomba para efectuar la liberación controlada o sostenida (véanse Langer, *supra*; 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 usarse materiales poliméricos para efectuar la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, por ejemplo, Goodson, J.M., capítulo 6 en Medical Applications of Controlled Release, Vol. II, Applications and Evaluation (Langer y Wise, editores) (CRC Press, Inc.,

Boca Raton, 1984), pp. 115-138; 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(1):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 WO 99/15154 y WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, sin limitaciones, 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 poliortoésteres. En una realización particular, el polímero usado en una formulación de liberación es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En aun otra forma de realización, puede colocarse 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, en *Medical Applications de Controlled Release*, mencionado con anterioridad, volumen 2, páginas 115-138 (1984).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por aquellos versados en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 4526938, la

Publicación PCT WO 91/05548, la Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al. (1996) *Radiotherapy 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. Matter.* 24:759-760.

En una forma de realización específica, cuando la composición de la invención 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°: 4.980.286), 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 de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, sin limitaciones, 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 una 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 de la invención serán administradas tópicamente, las composiciones pueden formularse en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por aquellos versados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* e *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª edición, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (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 mayor que el agua. Entre las formulaciones apropiadas se incluyen, sin limitaciones, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamo, y semejantes, que son, se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares por ejemplo, preservantes, estabilizadores, agentes de humectación, amortiguadores o sales) para afectar distintas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol rociables, en donde el ingrediente activo,

opcionalmente, 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 se pueden agregar 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 invención 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 para su uso de acuerdo con la presente invención 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 carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse con una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) se pueden formular 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 de la invención 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 se pueden preparar por medios convencionales, con

agentes excipientes farmacéuticamente aceptables, 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 sodio de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas se pueden recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos en el arte. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, en un sentido no limitativo, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar utilizando medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales 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, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para una administración oral se pueden formular convenientemente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención 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° 019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 y 5290540 y las Publicaciones PCT WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una forma de realización específica, un anticuerpo de la invención, una terapia combinada y/o una composición de la invención se administran usando la tecnología de administración pulmonar de drogas Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass., EEUU).

El método de la invención 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 se pueden presentar 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 su uso.

Además, los métodos de la invención pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones se pueden formular 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 de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables 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, se puede proveer una ampolla de agua para inyección o salina estéril para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, en la invención también se provee uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención 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, de la invención, 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 de la invención son suministrados como un polvo liofilizado seco estéril en un recipiente herméticamente sellado a una unidad dosificación de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deberían guardarse a una temperatura 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, dentro de los 5 días, dentro de las 72 horas, dentro de las 48 horas, dentro de las 24 horas, dentro de las 12 horas, dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después de su reconstitución. En una forma de realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, 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, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o

al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en de una composición farmacéutica apropiada para la administración parenteral. En una forma de realización, el anticuerpo o las porciones de anticuerpos se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 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 ámbar o sílex llenada con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre 1 y 50 mM), óptimamente entre 5 y 10 mM, a pH entre 5,0 y 7,0 (óptimamente a pH 6,0). Otras soluciones amortiguadoras adecuadas incluyen, en un sentido no limitativo, 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, en una concentración de entre 0 y 300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa en una proporción de entre 0 y 10% (óptimamente entre 0,5 y 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de relleno para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol 1-10% (preferiblemente 2-4%). Pueden usarse estabilizadores en formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (preferiblemente 5-10 mM). Otros agentes de relleno adecuados incluyen glicina, arginina, que pueden incluirse como polisorbato-80 0-0,05% (preferiblemente 0,005-0,01%). Los agentes

tensioactivos adicionales incluyen, sin limitaciones, polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ.

Las composiciones de esta invención se pueden encontrar en 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 particular 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. El modo de administración incluye el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización particular, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra forma de realización particular, 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 se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de droga alta. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) 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 métodos de preparación incluyen: 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 de la misma. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como 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 anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, la ruta/el modo de administración es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como podrá apreciar el especialista, la ruta y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. En determinadas formas de realización, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar 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, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención 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 se pueden incluir 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 se pueden incorporar con excipientes y usar en la forma de tabletas masticables, tabletas para disolución bucal, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y semejantes. Para administrar un compuesto de la invención 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 se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos adicionales. En determinadas formas de realización, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención está co-formulado 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 de TNF- α es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hTNF- α o una porción de anticuerpo de la invención 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 de la invención 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 las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con 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. Estos vehículos se describen, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N° 6660843.

En una realización específica, se administran secuencias de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, para tratar, prevenir, manejar o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas mediante terapia génica. 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 de la invención, los ácidos nucleicos producen el anticuerpo o el agente profiláctico o terapéutico de la invención codificado, que produce un efecto profiláctico o terapéutico.

Se pueden usar cualquiera de los métodos de terapia de genes disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. 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 comúnmente conocidos en la técnica del ADN recombinante que pueden usarse 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 proveen descripciones detalladas de los diversos métodos de terapia génica en la Publicación de Patente de los EEUU N° 2009/0297514.

La TNF- α cumple un rol crítico en la patología asociada con diversas enfermedades que comprenden respuestas inmunes e inflamatorias. 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 reumática 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 reumática; enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumática; 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 Sjörgren; 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*.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar pacientes humanos que sufren enfermedades autoinmunes, particularmente aquellas asociadas a la inflamación, la artritis reumática, la osteoartritis, la psoriasis, la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes.

Un anticuerpo, o una porción de anticuerpo, de la invención también puede ser administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son de utilidad en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de éstos, se pueden usar solos o en combinación para tratar dichas enfermedades. Ha de comprenderse que los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión a antígeno, pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos entrenados 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 condición que se está tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo beneficioso a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición.

También se debería comprender que las combinaciones que se van a incluir en la presente invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito que se le desea dar. Los agentes que se establecen más adelante se

dan con propósitos de ilustración y no con intención de ser taxativos. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden comprender los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional elegido entre las listas que se presentarán 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.

Las combinaciones particulares son droga(s) antiinflamatoria(s) no esteroide(s) que también se denominan NSSIDA que incluyen drogas como el ibuprofeno. Otras combinaciones son los corticosteroides incluyendo prednisolona; los bien conocidos efectos secundarios del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar disminuyendo la dosis requerida de esteroide cuando los pacientes son tratados con una combinación que incluye los anticuerpos anti-TNF- α de esta invención. Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para artritis reumática con los cuales pueden combinarse un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: droga(s) antiinflamatoria(s) supresor(as) de citoquina (CSAID); anticuerpos para otras citoquinas o factores de crecimiento humanos o antagonistas de éstos, por ejemplo, TNF, LT, I IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, 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, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones particulares de agentes terapéuticos pueden interferir en distintos puntos en la cascada autoinmune e inflamatoria subsiguiente. Los ejemplos incluyen antagonistas de TNF, como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos contra TNF, D2E7, (Publicación PCT Nº WO 97/29131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571 y receptores de TNF solubles de p55 o p75, derivados de éstos (p75TNFR1gG (EnbrelTM) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE); de manera similar, inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1, IL-1RA, etcétera), que pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones se realizan con la interleuquina 11. Otras combinaciones se realizan con miembros clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo con la función del TNF- α , de manera dependiente de ella o en combinación con ella. Otras combinaciones se realizan con inhibidores de CD4 no exhaustivos. Aun otras combinaciones incluyen antagonistas de la vía coestimuladora de CD80 (B7,1) o de CD86 (B7,2), incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de las mismas, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxiclороquina, 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-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de 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 los mismos (por ejemplo receptores de TNF solubles, p55 o p75 y los derivados p75TNFRlgG (EnbrelTM y p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxiclороquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato de oro y sodio, aspirina, triamcinolona acetónida, 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. Las combinaciones particulares incluyen metotrexato o leflunomida, y en casos de artritis moderada o severa, ciclosporina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico deseado. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico del anticuerpo o la porción de anticuerpo puede ser determinada por un aquellos entrenados en la técnica 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 la porción de anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una con la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la porción de anticuerpo será superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad eficaz para 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 uso profiláctico será menor que la cantidad eficaz para uso terapéutico.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden

administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar 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 lograr una 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 de la invención 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.

Ha de tenerse en cuenta que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la afección que se desee aliviar. También ha de comprenderse que, para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el correr del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional del encargado de administrar o supervisar la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente documentación solamente se presentan a modo de ejemplo y no han de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

Para aquellos versados en la técnica, ha de ser evidente que es posible realizar modificaciones y adaptaciones apropiadas a los métodos de la invención usando equivalentes apropiados, sin apartarse del alcance de la invención o las formas de realización que se describen en la presente documentación. La presente invención ha sido descrita en detalle, y será más fácil de comprender al hacer referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solamente con fines ilustrativos y no para limitar la invención.

Ejemplo 1. Anticuerpos recombinantes anti-TNF- α humano

Ejemplo 1.1. Construcción y expresión de anticuerpos anti-TNF- α humano quiméricos recombinantes

El ADN que codifica la región constante de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-TNF- α humano MAK195 se reemplazó por un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de la IgG1 humana, que contenía 2 mutaciones en la región de la bisagra, lo cual se realizó por 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.* 147:2657-2662). La región constante de la cadena liviana de cada una de estos anticuerpos fue reemplazada por una región constante kappa humana. Se expresaron anticuerpos quiméricos completos de manera transitoria en células HEK293, por medio de una transfección concurrente de ADNc quimérico de las cadenas pesada y liviana unido al plásmido de expresión pHybE. 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.

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

Ejemplo 1.2. Construcción de anticuerpos anti-TNF- α humano con CDR injertadas

Se injertaron las secuencias CDR de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal MAK195 (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 MAK195 de la presente invención, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas conocidas:

- a) VH4-59 (IGHV4-59) y VH3-53 (IGHV3-53), así como las secuencias de unión hJH4, para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- b) 1-39/O12 y 3-15/I2, así como hJK2, para construir las secuencias aceptoras de la cadena liviana

Mediante la inserción de las CDR correspondientes de la VH y la VL de MAK195 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon secuencias de la VH y la VL humanizadas y modificadas con CDR injertadas (véase también la tabla 6 anterior).

Ejemplo 1.3. Construcción de retromutaciones en el marco de trabajo de los anticuerpos con CDR injertadas

Para generar retromutaciones en el marco de trabajo de los anticuerpos humanizados, se introducen mutaciones en las secuencias de los anticuerpos con CDR injertadas que se prepararon de acuerdo con el ejemplo 1.2, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, así como con métodos bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, WO 2007/042261; WO 99/54440; Traunecker et al. (1987) *EMBO J.* 10(12):3655-9 y Lanzavecchia y Scheidegger (1987) *Eur. J. Immunol.*, 17(1):105-11). Se preparan distintas combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada una de las CDR injertadas. Más adelante se provee un resumen de las versiones de los diseños propuestos para cada anticuerpo humanizado. Los números de los residuos para estas mutaciones se basan en el sistema de numeración de Kabat.

Para la cadena pesada hMAK195VH.1z, se retromutó uno o más de los siguientes residuos en la interfase entre la zona de Vernier y la VH/VL: G27→F, I29→L, I37→V, I48→L V67→L, V71→K, T73→N, N76→S, y F78→I.

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

Para la cadena pesada hMAK195VH.2z, se retromutó uno o más de los siguientes residuos en la interfase entre la zona de Vernier y la VH/VL: A24→V, F29→L, V48→L, F67→L, R71→K, S49→G, N76→S, y L78→I.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación: Q1→E, I12→V, y V29→F.

Para la cadena liviana hMAK195Vk.1, se retromutó uno o más de los siguientes residuos en la interfase entre la zona de Vernier y la VH/VL: A43→S.

Para la cadena liviana hMAK195Vk.2z, se retromutó uno o más de los siguientes residuos en la interfase entre la zona de Vernier y la VH/VL: A43→S, I58→V.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación: V13→L, E70→D, y S80→P.

Ejemplo 1.4.Cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-hTNF- α humanizados con retromutaciones en el marco de trabajo

SEQ ID N°	Región proteica	Secuencia
		123456789012345678901234567890
SEQ ID N° 28	hMAK195VH.1	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SDYGVN WI RQPPGKGLEWIG MIWGDGSTDYDSTL KSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 29	hMAK195VH.1a	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSL SDYGVN WV RQPPGKGLEWLG MIWGDGSTDYDSTL KSRLTISKDNS KSQISLKLSSVTAADTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 30	hMAK195VH.1b	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSL SDYGVN WI RQPPGKGLEWIG MIWGDGSTDYDSTL KSRVTISKDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 31	hMAK195VH.2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS SDYGVN WV RQAPGKGLEWVS MIWGDGSTDYDSTL KSRFTISKDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 32	hMAK195VH.2a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLS SDYGVN WV RQAPGKGLEWLG MIWGDGSTDYDSTL KSRLTISKDNS KSTIYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 33	hMAK195VH.2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS SDYGVN WV RQAPGKGLEWVS MIWGDGSTDYDSTL KSRFTISKDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE EWHHG VPVAYWGQGT LVTVSS
SEQ ID N° 34	hMAK195Vk.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQAVSSA VAWYQ QKPGKSPKLLIY WASTRHT GVPSRFGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYC QQHYSTPFT FGQGTKLEIK
SEQ ID N° 35	hMAK195Vk.2	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC KASQAVSSA VAWYQ QKPGQAPRLLIY WASTRHT GIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFAVYYC QQHYSTPFT FGQGTKLEIK
SEQ ID N° 36	hMAK195Vk.2a	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC KASQAVSSA VAWYQ QKPGQSPRLLIY WASTRHT GVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFAVYYC QQHYSTPFT FGQGTKLEIK

Ejemplo 1.5. Apareamientos de VH/VL del anticuerpo anti-hTNF- α humanizado hMAK195

Designación del anticuerpo	VH	VL
AB240	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1
AB241	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1a
AB242	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2
AB243	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2a
AB244	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1
AB245	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1a
AB246	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2
AB247	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2a
AB248	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1
AB249	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1a
AB250	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2
AB251	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2a
AB252	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1
AB253	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1a
AB254	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2
AB255	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2a
AB256	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1
AB257	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1a
AB258	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2
AB259	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2a
AB260	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1
AB261	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1a
AB262	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2
AB263	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2a

Ejemplo 1.6. Determinación de la afinidad usando tecnología BIACORE

Tabla 7. 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 en el texto. Por ejemplo, se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU de anti-IgG de ratón de cabra, (Fc γ 2b), 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 aminos estándar de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del proveedor a 25 µg/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/min. Las constantes de asociación y disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}), se determinan con una velocidad de flujo continua de 25 µl/minuto. Las constantes se obtienen realizando mediciones de la unión cinética con distintas 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 8. Análisis BIACORE de los anticuerpos anti-hTNF- α

Designación del anticuerpo	VH	VL	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} ($-1/s$)	(M)
AB240	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1	1,64E+06	2,28E-03	1,40E-09
AB241	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1a	2,27E+06	1,30E-03	5,73E-10
AB242	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2	1,79E+06	1,42E-03	7,96E-10
AB243	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2a	1,22E+06	2,70E-03	1,62E-09
AB244	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1	3,80E+06	3,35E-04	8,91E-11
AB245	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1a	3,32E+06	3,30E-04	9,94E-11
AB246	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2	2,61E+06	1,19E-04	4,58E-11
AB247	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2a	2,62E+06	2,60E-04	9,96E-11
AB248	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1	1,82E+06	3,16E-04	1,74E-10
AB249	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1a	2,04E+06	3,15E-04	1,56E-10
AB250	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2	2,00E+06	3,56E-04	1,79E-10
AB251	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2a	1,71E+06	4,25E-04	2,50E-10
AB252	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1	2,92E+06	2,52E-04	8,66E-11
AB253	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1a	3,02E+05	2,21E-04	7,33E-11
AB254	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2	2,40E+06	2,87E-04	1,20E-10
AB255	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2a	2,62E+06	3,84E-04	1,48E-10
AB256	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1	3,54E+06	1,77E-04	5,05E-11
AB257	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1a	3,56E+06	2,17E-04	6,20E-11
AB258	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2	3,04E+06	2,44E-04	8,16E-11
AB259	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2a	3,00E+06	2,03E-04	6,77E-11
AB260	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1	2,27E+06	2,30E-04	1,01E-10
AB261	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1a	2,36E+04	2,85E-04	1,22E-10
AB262	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2	2,14E+06	2,90E-04	1,36E-10
AB263	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2a	1,61E+06	2,73E-04	1,69E-10

La unión de todas las construcciones de anticuerpos humanizados caracterizados con la tecnología de Biacore se mantuvo y fue comparable a la del anticuerpo murino progenitor.

Ejemplo 1.7. Neutralización del TNF- α humano

Se cultivaron células L929 hasta una densidad semi-confluyente y se las cosechó usando tripsina al 0,25% (Gibco#25300). Las células se lavaron con PBS, se contaron y se suspendieron nuevamente a razón de $1E6$ células/ml, en un medio de ensayo que contenía $4 \mu\text{g/ml}$ de actinomicina D. Las células se sembraron en una placa de 96 cavidades (Costar#3599), en un volumen de $100 \mu\text{l}$ y a razón de $5E4$ células/cavidad. Los anticuerpos y las IgG control se diluyeron hasta una concentración 4X en el medio del ensayo, para luego realizar diluciones de 1:4 en serie. El huTNF- α se diluyó hasta 400 pg/ml en el medio del ensayo. La muestra del anticuerpo ($200 \mu\text{l}$) se agregó al huTNF- α ($200 \mu\text{l}$) en un esquema de dilución de 1:2, después de lo cual se la incubó durante media hora a temperatura ambiente.

La solución de anticuerpo/TNF- α humano se agregó a las células en un volumen de $100 \mu\text{l}$, para alcanzar una concentración final de 100 pg/ml de huTNF- α y un rango de concentración para el anticuerpo de entre 150 nM y $0,0001 \text{ nM}$. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C , con 5% de CO_2 . Para cuantificar la viabilidad, se tomaron $100 \mu\text{l}$ de las cavidades y se agregaron $10 \mu\text{l}$ del reactivo WST-1 (Roche cat# 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 9 se provee la EC50 promedio de diversos ensayos.

Tabla 9. Ensayo de neutralización del TNF- α humano con anticuerpos anti-hTNF- α humanizados

Designación del anticuerpo	VH	VL	Ensayo de neutralización del TNF- α IC ₅₀ (nM)
AB240	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1	14,190
AB241	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1a	5,325
AB242	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2	25,150
AB243	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2a	50,710
AB244	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1	0,155
AB245	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1a	0,072
AB246	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2	0,099
AB247	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2a	0,186
AB248	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1	0,213
AB249	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1a	0,245
AB250	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2	0,301
AB251	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2a	0,350
AB252	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1	0,222
AB253	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1a	0,279
AB254	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2	0,799
AB255	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2a	0,477
AB256	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1	0,058
AB257	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1a	0,077
AB258	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2	0,078
AB259	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2a	0,071
AB260	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1	0,093
AB261	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1a	0,187
AB262	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2	0,218
AB263	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2a	0,193

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

Ejemplo 1.8. 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: Na_2SO_4 211 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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: temperatura ambiente

Duración de la corrida: 50 minutos

La Tabla 10 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 10. Pureza de los anticuerpos anti-hTNF- α , determinada con una cromatografía de exclusión por tamaño

Designación del anticuerpo	VH	VL	% de monómeros (pureza)
AB240	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1	88.6
AB241	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1a	93.4
AB242	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2	89.8
AB243	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2a	92.2
AB244	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1	100
AB245	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1a	99
AB246	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2	98.8
AB247	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2a	99
AB248	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1	93.5
AB249	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1a	96

AB250	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2	93.8
AB251	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2a	95.4
AB252	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1	98.4
AB253	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1a	98.6
AB254	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2	97.5
AB255	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2a	97.7
AB256	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1	95.7
AB257	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1a	96.7
AB258	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2	95.6
AB259	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2a	96.6
AB260	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1	99.1
AB261	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1a	100
AB262	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2	98.6
AB263	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2a	98.9

Los anticuerpos anti-hTNF- α presentaron un perfil de SEC excelente: la mayoría de ellos presentaron >95% del monómero.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (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° 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° 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 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 μ l. Se examinan todas las muestras simultáneamente usando un rotor de 4 cavidades (AN-60Ti) en una ultracentrífuga analítica Beckman ProteomeLab XL-I (N° 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 ($20,0 \pm 0$ °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: 35.000 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.

Número Total de Análisis: 100

Medición de peso molecular de LC-MS de anticuerpos intactos

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 N° 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°. 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°. Luego de la desglicosilación, la muestra se reduce con una concentración final de 10 mM DTT durante 30 minutos a 37°. 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 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° durante 60 minutos, seguido por alquilación con ácido iodoacético 50 mM (IAA) en oscuridad a 37° 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°. 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 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° 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°. 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-nitrobenzónico) (DTNB), con grupos sulfhidrilo (SH) la cual da lugar a un producto cromofórico característico, ácido 5-tio-(2-nitrobenzónico) (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 (β-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 β -ME se prepara por dilución seriada de 14,2 M β -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 centrífuga Amicon 10.000 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 ml de 100 mM de solución amortiguada con Tris, pH 8,1 a cada muestra y estándar seguido por el agregado de 300 ml 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 β -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° 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° durante 5 minutos en un termoagitador Eppendorf ajustado en 750 RPM para precipitar las proteínas, luego se colocan las muestras en una centrífuga Eppendorf durante 2 minutos a 10.000 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°.

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° 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°, 5°, 25°, o 40° durante 1, 2 ó 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, Gel Company, San Francisco, Calif., EEUU) y se usan los procedimientos recomendados dados por el proveedor.

Ejemplo 1.9. Transfección y expresión en células HEK 293-6E

Las construcciones que harían las veces de vectores para el anticuerpo anti-hTNF- α se transfectaron en células 293 para producir la proteína. El procedimiento de transfección transitoria utilizado es una modificación de los métodos publicados en Durocher et al. (2002) *Nucl. Acids Res.* 30(2e9):1-9 y Pham et al. (2005) *Biotech. Bioeng.* 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 (Polisciencences) 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 11 se proveen los datos del rendimiento de los anticuerpos progenitores, expresados como miligramos por litro en células HEK 293-6E.

Tabla 11. Expresión transitoria a través del rendimiento de anticuerpos anti-hTNF-α en células HEK 293-6E

Designación del anticuerpo	VH	VL	Rendimiento de expresión (mg/l)
AB240	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1	101,4
AB241	hMAK195VH.1	hMAK195VL.1a	100,4
AB242	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2	66,4
AB243	hMAK195VH.1	hMAK195VL.2a	89
AB244	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1	87,6
AB245	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.1a	83,8
AB246	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2	58,6
AB247	hMAK195VH.1a	hMAK195VL.2a	73

Designación del anticuerpo	VH	VL	Rendimiento de expresión (mg/l)
AB248	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1	83,2
AB249	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.1a	89
AB250	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2	65,4
AB251	hMAK195VH.1b	hMAK195VL.2a	77,2
AB252	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1	21,4
AB253	hMAK195VH.2	hMAK195VL.1a	52
AB254	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2	5,8
AB255	hMAK195VH.2	hMAK195VL.2a	12,56
AB256	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1	99,6
AB257	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.1a	102,8
AB258	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2	62
AB259	hMAK195VH.2a	hMAK195VL.2a	78,2
AB260	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1	69,4
AB261	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.1a	98,4
AB262	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2	30,8
AB263	hMAK195VH.2b	hMAK195VL.2a	49,2

Todos los anticuerpos se expresaron bien en las células HEK 293-6E. En la mayoría de los casos, fue posible obtener >50 mg/l del anticuerpo purificado a partir de los sobrenadantes de las células HEK 293-6E.

Incorporación a modo de referencia

La presente invención incorpora a modo de referencia y en su totalidad las técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular y la administración de drogas. Estas técnicas incluyen, sin limitaciones, las técnicas que se describen en las siguientes publicaciones: Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Ausubel, F. M. et al. editores, Short Protocols In Molecular Biology (4ª edición 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X). Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (editores), Wiley, Nueva York (1984); Giegé et al., capítulo 1 en Crystallization

of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach, 2ª edición, (Ducruix and Giegé, editores) (Oxford University Press, Nueva York, 1999) pp. 1-16; Goodson, J.M., capítulo 6 en Medical Applications of Controlled Release, Vol. II, Applications and Evaluation, (Langer and Wise, editores) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138; Hammerling et al., editores, "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", en Research Monographs in Immunology, vol. 3 (J.L. Turk, General Editor) (Elsevier, Nueva York, 1981), pp. 563-587; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1988); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987); Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Kontermann and Dübel, editores, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Lu and Weiner editores, Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, Mass. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X); Goodson, J.M., Medical Applications of Controlled Release, (Langer and Wise, editores) (CRC Press, Boca Raton, 1974); Old and Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3ª edición 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston; Studies in Microbiology, V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6); Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, (J.R. Robinson, ed.) (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978);

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, N.Y. (translated by Horst Ibelgauf), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

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 en la presente a modo de referencia en su totalidad, al igual que las referencias que se citan en ellas. A menos que se indique lo contrario, en la práctica de la presente invención se emplearán procedimientos convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular bien conocidos en la técnica.

Equivalentes

La invención puede ponerse en práctica en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o de sus características esenciales. Por lo tanto, las formas de realización precedentes han de interpretarse de manera ilustrativa en todos sus aspectos, y no como limitaciones para la invención que se describe en la presente. De esta manera, el alcance de la invención está delimitado por las reivindicaciones adjuntas, no por la descripción precedente, por lo que cualquier cambio en el significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones ha de quedar abarcado por la presente.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión al antígeno que puede unirse al factor de necrosis tumoral-alfa humano (TNF- α), donde el dominio de unión al antígeno comprende tres regiones de determinación de la complementariedad (CDRs) de la cadena pesada y tres CDRs de la cadena liviana,

en donde las tres CDRs de la cadena pesada comprenden:

CDR-H1, que comprende los residuos de aminoácido 31-35 de la SEQ ID NO:22;

CDR-H2, que comprende los residuos de aminoácido 50-65 de la SEQ ID NO:22;

CDR-H3, que comprende los residuos de aminoácido 98-106 de la SEQ ID NO:22;

en donde las tres CDRs de la cadena liviana comprenden:

CDR-L1, que comprende los residuos de aminoácido 24-34 de la SEQ ID NO:23;

CDR-L2, que comprende los residuos de aminoácido 50-56 de la SEQ ID NO:23;

CDR-L3, que comprende los residuos de aminoácido 89-97 de la SEQ ID NO:23;

en donde la proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende un marco de trabajo aceptor humano, en la que el marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°s 6-21.

2. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el marco de trabajo aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 y 21.
3. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADA PORQUE el marco de trabajo aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos.
4. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE la sustitución de aminoácidos en la VH se selecciona del grupo que consiste en: Q1E, I12V, A24V, G27F, I29L, V29F, F29L, I37V, I48L, V48L, S49G, V67L, F67L, V71K, R71K, T73N, N76S, L78I y F78I.
5. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE la sustitución de aminoácidos en la VL se selecciona del grupo que consiste en: V13L, A43S, I58V, E70D y S80P.
6. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma inhibe una función biológica del TNF- α .
7. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma neutraliza el TNF- α .
8. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión

o fragmento de unión a antígeno de la misma disminuye la capacidad del TNF- α de unirse a su receptor.

9. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma disminuye la capacidad del pro-TNF- α humano, del TNF- α humano maduro o de un TNF- α humano truncado de unirse a su receptor.

10. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma reduce una o más de las siguientes actividades: la producción de citoquina dependiente del TNF, la exterminación de células dependiente del TNF, la inflamación dependiente del TNF, la erosión ósea dependiente del TNF y el daño en los cartílagos dependiente del TNF.

11. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina que es: un dominio constante de la IgM humana, un dominio constante de la IgG1 humana, un dominio constante de la IgG2 humana, un dominio constante de la IgG3 humana, un dominio constante de la IgG4 humana, un dominio constante de la IgA humana o un dominio constante de la IgE humana.

12. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 11, CARACTERIZADA PORQUE el dominio

constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina es un dominio constante de la IgG1 humana.

13. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1 ó 11, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma también comprende un dominio constante de la cadena liviana de la inmunoglobulina que comprende un dominio constante de la Ig kappa humana o un dominio constante de la Ig lambda humana.

14. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 12, CARACTERIZADA PORQUE el dominio constante de la IgG1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N° 2 o de la SEQ ID N° 3.

15. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 13, CARACTERIZADA PORQUE el dominio constante de la Ig kappa humana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 4, o el dominio constante de la Ig lambda humana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 5.

16. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, que además comprende:

una región constante pesada de la inmunoglobulina (Ig) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3; y

una región constante liviana de la Ig que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5.

17. La proteína de unión humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión

o fragmento de unión a antígeno de la misma se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un fragmento Fv, un fragmento Fv con enlaces 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, un fragmento Fab', un anticuerpo biespecífico, un fragmento F(ab')₂, una DVD-Ig™, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región de la bisagra, un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, y un anticuerpo de cadena simple.

18. Una proteína de unión cristalizada CARACTERIZADA PORQUE comprende la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, donde la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma toma la forma de un cristal.

19. La proteína de unión cristalizada de la reivindicación 18, CARACTERIZADA PORQUE el cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículos.

20. Una composición para liberar una proteína que se une al TNF- α , CARACTERIZADA PORQUE comprende (a) una formulación, donde la formulación comprende la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1 ó 16, y un ingrediente, en donde el ingrediente se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina,

metoxipolietilenglicol y polietilenglicol; y (b) al menos un vehículo polimérico en donde el vehículo polimérico se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en ácido poli acrílico, poli cianoacrilato, un poli aminoácido, un poli anhídrido, un poli depsipéptido, un poli éster, poli ácido láctico, ácido poli láctico-co-glicólico, poli b-hidroxibutirato, poli caprolactona, poli dioxanona, poli etilenglicol, poli hidroxipropil metacrilamida, poli organofosfazeno, poli orto ésteres, alcohol poli vinílico, poli vinilpirrolidona, copolímeros de anhídrido maleico-éter alquil vinílico, polioles Pluronic, albúmina, alginato, celulosa y sus derivados, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados y las mezclas y los copolímeros de éstos.

21. La proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 16, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma está glicosilada.

22. La proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 16, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma es una proteína de unión a TNF- α cristalizada.

23. La proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 22, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión a TNF- α cristalizada es una proteína de unión a TNF- α cristalizada de liberación farmacéutica controlada que está libre de vehículos.

24. Un conjugado con una proteína de unión al factor de necrosis tumoral α (TNF- α) CARACTERIZADO PORQUE comprende la proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 16 y una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico o un agente citotóxico.

25. El conjugado con una proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 24, CARACTERIZADO PORQUE el agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética o biotina.
26. El conjugado con una proteína de unión al TNF- α de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE la radiomarca se selecciona del grupo que consiste en: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm .
27. El conjugado con una proteína de unión a TNF- α de la reivindicación 24, CARACTERIZADO PORQUE el 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 o un agente apoptótico.
28. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica una proteína de unión que comprende una secuencia de aminoácidos de la reivindicación 1.
29. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica una proteína de unión a TNF- α que comprende una secuencia de aminoácidos de la reivindicación 16.
30. Un vector CARACTERIZADO PORQUE comprende un ácido nucleico aislado de la reivindicación 28 ó 29, en donde el vector se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en: ADNpc, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.
31. Una célula huésped aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende un vector de la reivindicación 30.

32. La célula huésped aislada de la reivindicación 31, CARACTERIZADA PORQUE la célula huésped es una célula procariota.
33. La célula huésped aislada de la reivindicación 31, CARACTERIZADA PORQUE la célula huésped es una célula eucariota.
34. La célula huésped aislada de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en: una célula protista, una célula animal, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto.
35. La célula huésped aislada de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en: una célula CHO, una célula COS y una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.
36. Un método para producir la proteína de unión de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE comprende los pasos de cultivar una célula huésped aislada de la reivindicación 31 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión que se une al TNF- α .
37. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende una proteína de unión o fragmento de unión al antígeno de la misma de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable opera como un adyuvante, en donde el adyuvante es opcionalmente hialuronidasa.
38. La composición farmacéutica de la reivindicación 37, CARACTERIZADA PORQUE también comprende al menos un agente adicional.
39. La composición farmacéutica de la reivindicación 38, CARACTERIZADA PORQUE el agente adicional es un agente terapéutico, un agente para el

diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasas, un bloqueador de moléculas de co-estimulación, un bloqueador de moléculas de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, el metotrexato, la ciclosporina, la rapamicina, FK506, una marca o un indicador, un antagonista del TNF- α , un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroideal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador 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 citoquinas.

40. Un método *in vitro* para determinar la presencia del TNF- α o de un fragmento de éste en una muestra de prueba a través de un inmunoensayo, CARACTERIZADO PORQUE el inmunoensayo comprende poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o con un fragmento de ésta, y con al menos una marca detectable.

41. El método *in vitro* de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el método *in vitro* también comprende los siguientes pasos:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con la al menos una proteína de unión, o con un fragmento de ésta, donde la proteína de unión se une a un epítopo en el TNF- α o a un fragmento de éste, para formar un primer complejo;

- (ii) poner en contacto el complejo con la al menos una marca detectable, donde la marca detectable se une a un epítopo en el primer complejo o en el TNF- α , o en un fragmento de éste, que no está unido a la proteína de unión o al fragmento de ésta, para formar un segundo complejo; y
- (iii) detectar la presencia del TNF- α o de un fragmento de éste en la muestra de prueba, sobre la base de la señal generada por la marca detectable en el segundo complejo, donde la presencia del TNF- α o del fragmento de éste está correlacionada directamente con la señal generada por la marca detectable.

42. El método *in vitro* de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el método *in vitro* también comprende los siguientes pasos:

- (i) poner en contacto la muestra de prueba con la al menos una proteína de unión, o con un fragmento de ésta, donde la proteína de unión, o el fragmento de ésta, se une a un epítopo en el TNF- α o a un fragmento de éste, para formar un primer complejo;
- (ii) poner en contacto el complejo con la al menos una marca detectable, donde la marca detectable compite con el TNF- α o con un fragmento de éste por la unión a la proteína de unión o a un fragmento de ésta, para formar un segundo complejo; y
- (iii) detectar la presencia del TNF- α o de un fragmento de éste en la muestra de prueba, sobre la base de la señal generada por la marca detectable en el segundo complejo, donde la presencia del TNF- α o del fragmento de éste está correlacionada indirectamente con la señal generada por la marca detectable.

43. El método *in vitro* de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el método *in vitro* opcionalmente también comprende diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficiencia del tratamiento terapéutico/profiláctico en el paciente.

 SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA 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: 30-10-12 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/321,633 07-04-10 US	(51) Int Cl: A61K 39/395 (71) Solicitante(s): ABBVIE, INC. (72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; GHAYUR, Tariq; GOODREAU, Carrie, L.; ISAKSON, Peter C. y SALFELD, Jochen. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-11-12 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06-04-11 No. de solicitud: PCT/US2011/031381	(87) Publicación internacional Fecha: 13-10-11 No. publicación: WO 2011/127141 A1
(54) Titulo: "PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF-α"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Proteínas de unión aisladas, por ejemplo, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), por ejemplo, al TNF-α humano. Composiciones basadas en anticuerpos. Moléculas relacionadas. Composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos. Métodos terapéuticos y de diagnóstico donde se emplean dichos anticuerpos.

Sector: Industria farmacéutica, preparaciones médicas compuestas por anticuerpos para métodos de tratamiento y diagnostico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF-ALFA

<130> ABT-123.1 AR

<140>

<141>

<150> 61/321,633

<151> 2010-04-07

<160> 36

<170> PatentIn version 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				

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
 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

<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> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 20 25 30

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

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

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 14

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

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

<400> 14
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 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> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
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> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 20
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 22
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 23
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 23
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Thr Val Gly

1				5					10						15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ala	Val	Ser	Ser	Ala	
			20					25					30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Val	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	His	Asn	Leu	Gln	Ala	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Leu	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Phe	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
			100					105								
<210> 24																
<211> 117																
<212> PRT																
<213> Secuencia Artificial																
<220>																
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético																
<400> 24																
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Val	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asp	Ser	Thr	Leu	Lys	
	50					55					60					
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
65					70					75					80	
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
Arg	Glu	Trp	His	His	Gly	Pro	Val	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Leu	

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 26
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 Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr 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 His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 28
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 33

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

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

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

Ser Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 34
 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 Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala
 20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr 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 His Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95

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

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 35
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95

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

Los abajo firmantes,

AbbVie Inc., una compañía organizada y existente bajo las leyes de Delaware

con domicilio en

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, Estados Unidos.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO 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.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO 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.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO 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.

The undersign,

AbbVie Inc., a company organized and existing under the laws of Delaware

domiciled at

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or 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.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or 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.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or 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/ Given and signed this

 1/22/2014

William J. Chase

Executive Vice President, and Chief Financial
Officer

AbbVie Inc.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		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: (51) Clasificación Internacional: A61K 39/395		(22) Fecha de solicitud: 30-10-12	
(71) Solicitante(s): ABBVIE, INC.			
(72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; GHAYUR, Tariq; GOODREAU, Carrie, L.; ISAKSON, Peter C. y SALFELD, Jochen.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/321,633	(32) Fecha 07-04-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-11-12		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06-04-11 No. de solicitud: PCT/US2011/031381		Fecha: 13-10-11 No. Publicación: WO 2011/127141 A1	
(54) Título: PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF-α.			
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- Proteínas de unión aisladas, por ejemplo, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de éstos, que se unen al factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), por ejemplo, al TNF-α humano. Composiciones basadas en anticuerpos. Moléculas relacionadas. Composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos. Métodos terapéuticos y de diagnóstico donde se emplean dichos anticuerpos.			
Sector: Industria farmacéutica, preparaciones médicas compuestas por anticuerpos para métodos de tratamiento y diagnostico			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		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: 30-10-12	
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/395			
(71) Solicitante(s): ABBVIE, INC.			
(72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; GHAYUR, Tariq; GOODREAU, Carrie, L.; ISAKSON, Peter C. y SALFELD, Jochen.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/321,633	(32) Fecha 07-04-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-11-12		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06-04-11 No. de solicitud: PCT/US2011/031381		Fecha: 13-10-11 No. publicación: WO 2011/127141 A1	
(54) Título: PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL TNF-α.			

TRADUCCION OFICIAL No. 2012-10-29-702
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

TRASPASO

Yo/Nosotros,

- (1) Lorenzo Benatuil,
- (2) Tariq Ghayur,
- (3) Carrie L. Goodreau,
- (4) Peter C. Isakson y
- (5) Jochen Salfeld

residentes, respectivamente, en

- (1) 33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532 (EE.UU.),
- (2) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (EE.UU.),
- (3) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (EE.UU.),
- (4) 14 Hillside Avenue, Southborough, MA 01722 (EE.UU.) y
- (5) 177 Old Westboro Road, No. Grafton, MA 01536

por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de lo cual se reconoce por el presente, he traspasado, vendido y transferido a y por el presente traspaso, vendo y transfiero a Abbott Laboratories, una sociedad constituida y existente bajo 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) todo el derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países en todo el mundo en y de cualquiera y todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos revelados en la Solicitud de los Estados Unidos No. Serial 13/081,212, presentada el 06 de abril de 2011 {Expediente No. ABT-123.1 US; Expediente No. 10426USO1} y Solicitud Internacional No. Serial PCT/US2011/031381, presentada el 06 de abril de 2011 {Expediente No. ABT-1231 WO; Expediente No. 10426WOO1} y designando a 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, CI, 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, 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 y ZW; llamada: "PROTEINAS QUE SE UNEN AL TNF- α ", incluyendo cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensiones, continuaciones y divisiones de la misma, y cualquier solicitud sustituta, por lo tanto;

2) el derecho pleno y completo para registrar solicitudes de patente en nombre de Abbott Laboratories, su persona nombrada, o en mi nombre a elección de Abbott Laboratories o su persona nombrada, sobre las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriormente nombrados en todos los países del mundo;

3) todo el derecho, título e interés en y de cualquier Patente de Invención que pueda expedirse sobre ello en los Estados Unidos o en cualquier otro país del mundo y cualquier renovación, recuperación, reemisión reexamen y extensión de las mismas; y

4) todo el derecho, título e interés en todas las Convenciones y Derechos de Tratados de toda clase sobre ello, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y de las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriores.

Por el presente autorizamos y le solicitamos a las autoridades competentes que otorguen y expidan cualquiera y todas las Patentes de Invención en los Estados Unidos y en todo el mundo a Abbott Laboratories como el cesionario de todo derecho, título e interés en el presente, tan completa y enteramente como si el mismo hubiese sido tenido y disfrutado por nosotros si este traspaso, venta y transferencia no se hubiese hecho.

Además acordamos, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, ejecutar y entregar a Abbott Laboratories cualquier solicitud adicional para patente para dichas invenciones y descubrimientos, o cualquier parte o partes de las mismas, y cualquier solicitud para patente de confirmación, registro e importación con base en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, recuperaciones, reemisiones, reexámenes y extensiones de las mismas.

Además acordamos en cualquier momento ejecutar y entregar a solicitud de Abbott Laboratories dichos documentos adicionales, si hubiese, según sean necesarios o deseables para asegurar la protección de patente sobre dichas invenciones, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo, y de lo contrario hacer lo que sea necesario para darle pleno efecto a y perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories bajo este Traspaso, incluyendo la ejecución, entrega y procura de cualquiera y todos los documentos adicionales que evidencien este traspaso, transferencia y venta según sea necesario o deseable.

CEDENTES:

(1) (firma: ilegible)
Lorenzo BENATUIL

RECONOCIMIENTO:

En este día 6 de mayo de 2011, Lorenzo BENATUIL compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines ahí expresados.

(firma: ilegible)
Firma del testigo
(firma: ilegible)
Nombre del testigo

CEDENTES:

(2) (firma: ilegible)
Tariq GHAYUR

RECONOCIMIENTO:

En este día 6 de mayo de 2011, Tariq GHAYUR compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines ahí expresados.

(firma: ilegible)
Firma del testigo
(firma: ilegible)
Nombre del testigo

CEDENTES:

(3) (firma: ilegible)
Carrie L. GOODREAU

RECONOCIMIENTO:

En este día 6 de mayo de 2011, Carrie L. GOODREAU compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo

(4) (firma: ilegible)¹

Peter C. ISAKSON

RECONOCIMIENTO:

En este día 9 de junio de 2009, Peter C. ISAKSON compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo

(5) (firma: ilegible)

Jochen SALFELD

RECONOCIMIENTO:

En este día 6 de mayo de 2011, Jochen SALFELD compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 29 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

¹ Nota del Traductor: No se repite el documento. Se incluyen todas las firmas de los inventores seguidas.

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Lorenzo Benatuil,
- (2) Tariq Ghayur,
- (3) Carrie L. Goodreau,
- (4) Peter C. Isakson and
- (5) Jochen Salfeld

residing, respectively, at

- (1) 33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532 (US),
- (2) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US),
- (3) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (US),
- (4) 14 Hillside Avenue, Southborough, MA 01722 (US) and
- (5) 177 Old Westboro Road, No. Grafton, MA 01536

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. 13/081,212, filed 06 April 2011 {Atty. Docket No. ABT-123.1 US; Client Docket No. 10426USO1} and International Application Ser. No. PCT/US2011/031381, filed 06 April 2011 {Atty. Docket No. ABT-123.1 WO; Client Docket No. 10426WOO1} 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, 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, 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- α BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefore;

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.

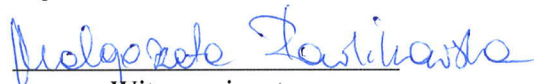
We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary 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) 
Lorenzo BENATUIL

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 6 day of May, 2011, Lorenzo BENATUIL 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.

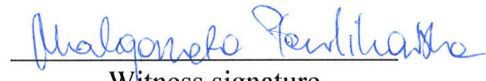

Witness signature

MARGARITA PAWLICKA
Witness name (please print)

(2) 
Tariq GHAYUR

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 6 day of May, 2011, 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

MARGARITA PAWLICKA
Witness name (please print)

(3) Carrie L. Goodreau
Carrie L. GOODREAU

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 6 day of May, 2011, 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.

Margorata Paulkowska

Witness signature

MARGORATA PAULKOWSKA

Witness name (please print)

(4) _____
Peter C. ISAKSON

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2011, Peter C. ISAKSON 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)

(5) Jochen SALFELD
Jochen SALFELD

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 6 day of May, 2011, Jochen SALFELD 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.

Margorata Paulkowska

Witness signature

MARGORATA PAULKOWSKA

Witness name (please print)

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Lorenzo Benatuil,
- (2) Tariq Ghayur,
- (3) Carrie L. Goodreau,
- (4) Peter C. Isakson and
- (5) Jochen Salfeld

residing, respectively, at

- (1) 33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532 (US),
- (2) 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US),
- (3) 201 Stevens Street, Ludlow, MA 01056 (US),
- (4) 14 Hillside Avenue, Southborough, MA 01722 (US) and
- (5) 177 Old Westboro Road, No. Grafton, MA 01536

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. 13/081,212, filed 06 April 2011 {Atty. Docket No. ABT-123.1 US; Client Docket No. 10426USO1} and International Application Ser. No. PCT/US2011/031381, filed 06 April 2011 {Atty. Docket No. ABT-123.1 WO; Client Docket No. 10426WOO1} 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, 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, 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- α BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefore;

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) _____
Lorenzo BENATUIL

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2011, Lorenzo BENATUIL 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) _____
Tariq GHAYUR

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2011, 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)

(3) _____
Carrie L. GOODREAU

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2011, 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.

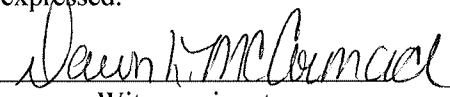
Witness signature

Witness name (please print)

(4) 
Peter C. ISAKSON

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 9th day of MAY, 2011, Peter C. ISAKSON 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

DAWN L. MCCORMACK
Witness name (please print)

(5) _____
Jochen SALFELD

ACKNOWLEDGEMENT:

On this _____ day of _____, 2011, Jochen SALFELD 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)