



Superintendencia de Industria y Comercio



No. 13-102367-00024-0000

Fecha: 2015-09-14 14:53:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios 7-8

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio



No. 15-216687-00000-0000

Fecha: 2015-09-14 14:53:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios 7-8

SOLICITUD DIVISIONAL
DE PATENTE DE
INVENCION

Superintendencia de Industria y Comercio



No. 15-197728-00000-0000

Fecha: 2015-08-24 16:52:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios 7-8

TITULO: ANTICUERPOS ESTABLES Y SOLUBLES.

SOLICITANTE: ESBATECH A NOVARTIS COMPANY LLC.

EXPEDIENTE No. 13-102.367

DIRECCIÓN: Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren (CH).

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 24 de agosto de 2015

P2013/000058B



No. 15-216687-00000-0000

Fecha: 2015-09-14 14:53:13 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

No. 13-102367-00024-0000

Fecha: 2015-09-14 14:53:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8Fecha: 2015-09-14 14:53:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-8Lvs. 3/8 FASENACIONALI
Folios: 7-8DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

☐

Persona Natural

☒

Persona Jurídica

ESBATECH A NOVARTIS COMPANY LLC

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐

Micro

☐

Pequeña

☐

Mediana

☐

Otra

Documento de Identificación

☐

C.C.

☐

C.E.

☒

NIT

☐

Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Suiza	Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren	Zürich
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐

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:

CARLOS R. OLARTE

Apellidos y Nombre

79.782.747 Bta

Documento de identificación

74.295

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@mourer.com	601-7799	601-7700

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

4. Datos del trámite:

CONVERSION

Expediente No.

De:

A:

DIVISION

Expediente No.

13-102.367

No. de divisionales

FUSION

Expediente No.

Expediente No.

5. Comprobante de Pago No	Fecha	D	M	A
---------------------------	-------	---	---	---

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	
CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000058B

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: ESBATECH A NOVARTIS
COMPANY LLC

Dirección: Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CH2011/000256

Fecha Octubre 24, 2011

Publicación Internacional No. WO 2012/051734

Fecha Abril 26, 2012

6

Título (54) ANTICUERPOS ESTABLES Y SOLUBLES.

Clasificación Internacional (51) C07K 16/24.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Octubre 22, 2010

Mayo 11, 2011

(31) Número de
Solicitud

61/405,798

61/484,749

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha _____

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

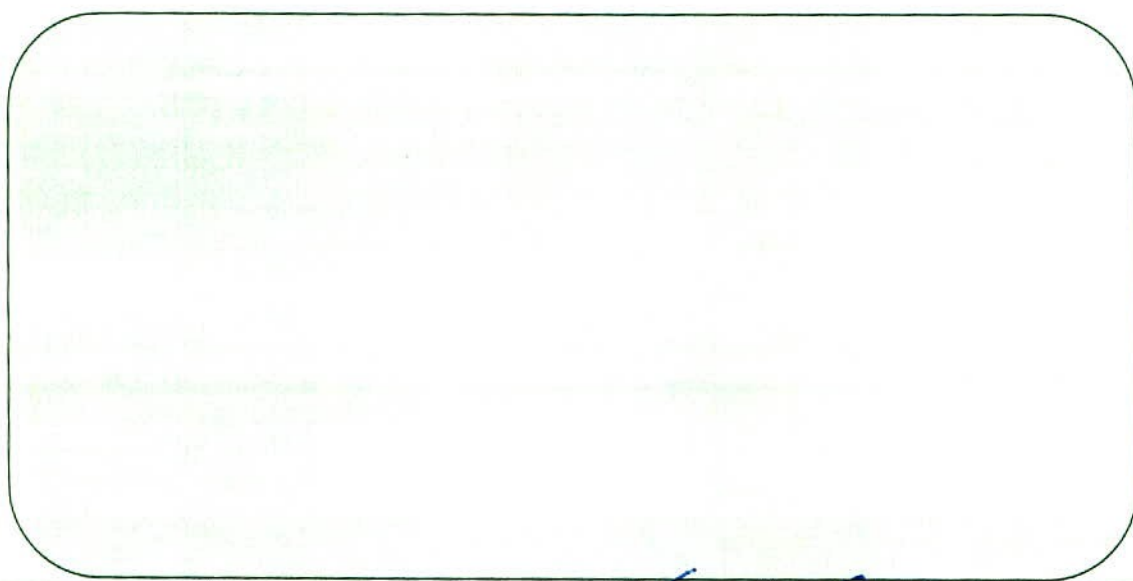
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Formulario IB 306.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____

C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES**PCT/CH2011/000256****Leonardo BORRAS**

Bundentalstrasse 1

CH-8952 Schlieren

Suiza

Nacionalidad: Costaricense

David URECH

Widmen 8

CH-8634 Hombrechtikon

Suiza

Nacionalidad: Suizo

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0092957

Bogotá D.C., Agosto 24 de 2015 - 16:35:44

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	88496	11/08/2015	15.500.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	90809	19/08/2015	864.000.00

*** 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. 15-216687-00000-0000
Fecha: 2015-09-14 14:53:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

Fecha: 2015-08-24 16:52:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-102367-00024-0000
Fecha: 2015-09-14 14:53:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-8

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

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

Agosto 24 de 2015 - 16:35:44



No. 13-102367-00024-0000

Indu
SUPI

Fecha: 2015-09-14 14:53:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-8



No. 15-216687-00000-0000

Fecha: 2015-09-14 14:53:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión	☒ División	☐ Fusión
☒ Patente de Invención		
☐ Patente de Modelo de Utilidad		

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural	☒ Persona Jurídica
--	--

ESBATECH A NOVARTIS COMPANY LLC

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra

Documento de Identificación ☐ C.C. ☐ C.E. ☒ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Suiza	Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren Suiza	Zürich
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐	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:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@mour.com	601-7799	601-7700

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

4. Datos del trámite:

CONVERSION Expediente No. _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente No. 13-102.367 No. de divisionales _____	FUSION Expediente No. _____ Expediente No. _____
--	---	---

5. Comprobante de Pago No _____	Fecha	<table><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>			

6. Anexos

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

7. Firma

CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional



ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/CH2011/000256

Leonardo BORRAS

Bundentalstrasse 1
CH-8952 Schlieren
Suiza
Nacionalidad: Costaricense

David URECH

Widmen 8
CH-8634 Hombrechtikon
Suiza
Nacionalidad: Suizo



(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/CH2011/000256

(22) International Filing Date:
24 October 2011 (24.10.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/405,798 22 October 2010 (22.10.2010) US
61/484,749 11 May 2011 (11.05.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ESBAT-ECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC** [CH/CH]; Wagistrasse 21, CH-8952 Schlieren (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BORRAS, Leonardo** [CH/CH]; Bundentalstrasse 1, CH-8952 Schlieren (CH). **URECH, David** [CH/CH]; Widmen 8, CH-8634 Hombrechtikon (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: STABLE AND SOLUBLE ANTIBODIES

(57) Abstract: The disclosure provides antibodies that are modified to reduce aggregation propensity, and methods of producing such antibodies. The present disclosure also provides particularly stable and soluble scFv antibodies and Fab fragments specific for TNF, which comprise specific light chain and heavy chain sequences that are optimized for stability, solubility, in vitro and in vivo binding of TNF, and low immunogenicity. The nucleic acids, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies of the disclosure, methods for isolating them and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.



STABLE AND SOLUBLE ANTIBODIES

Cross-Reference to Related Applications

5 This application claims priority under 35 U.S.C. §119 to U.S. Provisional Patent Application Nos. 61/405,798 filed October 22, 2010, and 61/484,749 filed May 11, 2011 the entire contents of which are incorporated herein by reference.

Field of the Invention

10 The invention relates to methods of reducing aggregation propensity of antibodies, and antibodies that are modified to reduce aggregation propensity. The invention also relates to antibodies that bind tumor necrosis factor alpha (TNF α). In particular, the invention relates to stable and soluble antibodies comprising an aggregation-reducing modification, including scFv antibodies and Fab fragments, which comprise specific light
15 chain and heavy chain sequences that are optimized for stability, solubility, and low immunogenicity. In addition, the invention relates to methods for the diagnosis and/or treatment of TNF-mediated disorders.

Background of the Invention

20 Tumour necrosis factor alpha (TNF α , also known as cachectin), is a naturally occurring mammalian cytokine produced by numerous cell types, including monocytes and macrophages in response to endotoxin or other stimuli. TNF α is a major mediator of inflammatory, immunological, and pathophysiological reactions (Grell, M., et al. (1995) Cell, 83: 793-802).

25 Soluble TNF α is formed by the cleavage of a precursor transmembrane protein (Kriegler, et al. (1988) Cell 53: 45-53), and the secreted 17 kDa polypeptides assemble to soluble homotrimer complexes (Smith, et al. (1987), J. Biol. Chem. 262: 6951-6954; for reviews of TNF α , see Butler, et al. (1986), Nature 320:584; Old (1986), Science 230: 630). These complexes then bind to receptors found on a variety of cells. Binding produces an
30 array of pro-inflammatory effects, including (i) release of other pro-inflammatory cytokines

such as interleukin (IL)-6, IL-8, and IL-1, (ii) release of matrix metalloproteinases and (iii) up regulation of the expression of endothelial adhesion molecules, further amplifying the inflammatory and immune cascade by attracting leukocytes into extravascular tissues.

5 A large number of disorders are associated with elevated levels of TNF α , many of them of significant medical importance. TNF α has been shown to be up-regulated in a number of human diseases, including chronic diseases such as rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disorders including Crohn's disease and ulcerative colitis, sepsis, congestive heart failure, asthma bronchiale and multiple sclerosis. Mice transgenic for human TNF α produce high levels of TNF α constitutively and develop a spontaneous, destructive
10 polyarthritis resembling RA (Keffer et al. 1991, EMBO J., 10,4025-4031). TNF α is therefore referred to as a pro-inflammatory cytokine.

TNF α is now well established as key in the pathogenesis of RA, which is a chronic, progressive and debilitating disease characterised by polyarticular joint inflammation and destruction, with systemic symptoms of fever and malaise and fatigue. RA also leads to
15 chronic synovial inflammation, with frequent progression to articular cartilage and bone destruction. Increased levels of TNF α are found in both the synovial fluid and peripheral blood of patients suffering from RA. When TNF α blocking agents are administered to patients suffering from RA, they reduce inflammation, improve symptoms and retard joint damage (McKown et al. (1999), Arthritis Rheum. 42:1204-1208).

20 Physiologically, TNF α is also associated with protection from particular infections (Cerami. et al. (1988), Immunol. Today 9:28). TNF α is released by macrophages that have been activated by lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. As such, TNF α appears to be an endogenous mediator of central importance involved in the development and pathogenesis of endotoxic shock associated with bacterial sepsis (Michie, et al. (1989), Br.
25 J.Surg.76:670-671.; Debets. et al. (1989), Second Vienna Shock Forum, p. 463-466; Simpson, et al. (1989) Crit. Care Clin. 5: 27-47; Waage et al. (1987). Lancet 1: 355-357; Hammerle. et al. (1989) Second Vienna Shock Forum p. 715-718; Debets. et al. (1989), Crit. Care Med. 17:489-497; Calandra. et al. (1990), J. Infect. Dis. 161:982-987; Revhaug et al. (1988), Arch. Surg. 123:162-170).

30 As with other organ systems, TNF α has also been shown to play a key role in the central nervous system, in particular in inflammatory and autoimmune disorders of the nervous system, including multiple sclerosis, Guillain-Barre syndrome and myasthenia

gravis, and in degenerative disorders of the nervous system, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease. TNF α is also involved in disorders of related systems of the retina and of muscle, including optic neuritis, macular degeneration, diabetic retinopathy, dermatomyositis, amyotrophic lateral sclerosis, and muscular dystrophy, as well as in injuries to the nervous system, including traumatic brain injury, acute spinal cord injury, and stroke.

Hepatitis is another TNF α -related inflammatory disorder which among other triggers can be caused by viral infections, including Epstein-Barr, cytomegalovirus, and hepatitis A-E viruses. Hepatitis causes acute liver inflammation in the portal and lobular region, followed by fibrosis and tumor progression. TNF α can also mediate cachexia in cancer, which causes most cancer morbidity and mortality (Tisdale M.J. (2004), Langenbecks Arch Surg. 389:299-305).

The key role played by TNF α in inflammation, cellular immune responses and the pathology of many diseases has led to the search for antagonists of TNF α . One class of TNF α antagonists designed for the treatment of TNF α -mediated diseases are antibodies or antibody fragments that specifically bind TNF α and thereby block its function. The use of anti-TNF α antibodies has shown that a blockade of TNF α can reverse effects attributed to TNF α including decreases in IL-1, GM-CSF, IL-6, IL-8, adhesion molecules and tissue destruction (Feldmann et al. (1997), Adv. Immunol. 1997:283-350). Among the specific inhibitors of TNF α that have recently become commercially available include a monoclonal, chimeric mouse-human antibody directed against TNF α (infliximab, RemicadeTM; Centocor Corporation/Johnson & Johnson) has demonstrated clinical efficacy in the treatment of RA and Crohn's disease. Despite these advances, there remains a need for new and effective forms of antibodies or other antibodies for the treatment for TNF α -associated disorders such as RA. In particular, there is an urgent need for antibodies with optimal functional properties for the effective and continuous treatment of arthritis and other TNF α -mediated disorders.

Summary of the Invention

The invention provides antibodies comprising at least one aggregation-reducing mutation and methods for producing such antibodies.

In one aspect, the invention provides a method of reducing the propensity for aggregation of an antibody, the method comprising introducing one or more aggregation-

reducing modifications at a residue position participating in the interface between the variable light chain and the variable heavy chain of an antibody, wherein the substitution reduces the free energy between the variable light chain and variable heavy chain by at least 0.5 kcal/mol, thereby reducing the aggregation propensity of the modified antibody compared with that of a parental antibody that lacks the aggregation-reducing modification(s).

In one aspect, a method of the invention comprises introducing one or more amino acid substitutions in the interface of a variable light chain (VL) and a variable heavy chain (VH) of the antibody, wherein the one or more substitutions are at residue positions selected to reduce the free energy between the VL and VH by at least 10%, thereby reducing the aggregation propensity of the antibody compared with a parental antibody. In a particular aspect, the sequence of the variable light chain of the antibody has at least 65% identity to the sequence of SEQ ID NO: 1. In other aspects, the variable heavy chain sequence has at least 85% identity to the sequence of SEQ ID NO: 3 or the sequence of SEQ ID NO: 4.

In certain aspects, a method of the invention comprises modifying the residue at AHo position 50 and/or the residue at AHo position 47 in the variable light chain of an antibody, thereby reducing the aggregation propensity of the antibody compared with a parental antibody. In other aspects, the method of the invention further comprises modifying residues at AHo position 12, 103, and 144 of the variable heavy chain.

The invention also provides antibodies having reduced propensity for aggregation comprising one or more aggregation-reducing modifications. In certain aspects, an antibody of the invention is a Fab, Fab', a F(ab)'2, single-chain Fv (scFv), an Fv fragment, or a linear antibody. In other aspects, the invention provides a bispecific or bivalent molecule comprising an antibody of the invention.

In other aspects, the aggregation-reducing modification is at AHo position 50 of the variable light chain. In a particular aspect, the aggregation-reducing modification comprises an arginine (R) at AHo position 50 of the variable light chain. In yet another aspect, the aggregation-reducing modification comprises a substitution of lysine (K) by arginine (R) at AHo position 50 of the variable light chain.

In still other aspects, the aggregation-reducing modification is at AHo position 47 of the variable light chain. In a particular aspect, the aggregation-reducing modification comprises an arginine (R) at AHo position 47 of the variable light chain. In yet another

aspect, the aggregation-reducing modification comprises a substitution of lysine (K) by arginine (R) at AHo position 47 of the variable light chain.

The invention also provides stable and soluble antibodies specific for TNF α , which comprise specific light chain and heavy chain sequences that are optimized for stability, solubility, *in vitro* and *in vivo* binding of TNF α , and low immunogenicity. Said antibodies are designed for the diagnosis and/or treatment of TNF α -mediated disorders. The nucleic acids, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies, variable light chains, and variable heavy chains of the invention, methods for isolating them and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.

The invention also provides methods of treating a TNF α -mediated disorder comprising administering to a subject in need thereof the pharmaceutical composition comprising an anti-TNF α antibody of the invention. In certain aspects, the TNF α -mediated disorder is an ocular disorder selected from the group consisting of uveitis, Bechet's disease, retinitis, dry eye, glaucoma, Sjörger syndrome, diabetic neuropathy, scleritis, age related macular degeneration and keratitis.

Specific preferred embodiments of the invention will become evident from the following more detailed description of certain preferred embodiments and the claims.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows titration curves of residue positions VL47 (solid lines) and VL50 (dashed lines) in two different scFv molecules, 34rFW1.4 (black) and 578rFW1.4 (gray).

Figure 2A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 2B shows stability of 34rFW1.4_VLK50R_DHP under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 3A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 40mg/ml concentration.

Figure 3B shows stability of 34rFW1.4_VLK50R_DHP under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 40mg/ml concentration.

Figure 4A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Figure 4B shows stability of 34rFW1.4_VLK50R_DHP under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Figure 5A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 5B shows stability of 34rFW1.4_VL_K50R under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 6A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 40mg/ml concentration.

Figure 6B shows stability of 34rFW1.4_VLK50R under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 40mg/ml concentration.

Figure 7A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Figure 7B shows stability of 34rFW1.4_VLK50R under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Figure 8A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 8B shows stability of 34rFW1.4_K47R under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 60mg/ml concentration.

Figure 9A shows stability of 34rFW1.4 under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Figure 9B shows stability of 34rFW1.4_K47R under accelerated conditions determined by SE-HPLC analysis after 2 weeks incubation at 40°C and using 20mg/ml concentration.

Detailed Description of the Invention

It is a general object of the invention to provide stable and soluble antibodies having reduced propensity for aggregating in solution. In a preferred embodiment said antibody is a scFv antibody or Fab fragment. The antibodies of the invention preferably comprise a light and heavy chain as disclosed herein.

The particulars shown herein are by way of example and for purposes of illustrative discussion of the preferred embodiments of the present invention only and are presented in the cause of providing what is believed to be the most useful and readily understood description of the principles and conceptual aspects of various embodiments of the invention. In this regard, no attempt is made to show structural details of the invention in more detail than is necessary for the fundamental understanding of the invention, the description taken with the drawings and/or examples making apparent to those skilled in the art how the several forms of the invention may be embodied in practice.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms will be defined as follows. Additional definitions are set forth throughout the detailed description. The following definitions and explanations are meant and intended to be controlling in any future construction unless clearly and unambiguously modified in the following examples or when application of the meaning renders any construction meaningless or essentially meaningless. In cases where the construction of the term would render it meaningless or essentially meaningless, the definition should be taken from Webster's Dictionary, 3rd Edition or a dictionary known to those of skill in the art, such as the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

The term "antibody" as used herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion," "antigen binding polypeptide," or "immunobinder") or single chain thereof. An "antibody" includes a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain

constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

The term “antigen-binding portion” of an antibody (or simply “antibody portion”) refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, TNF). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term “antigen-binding portion” of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L, V_H, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a single domain or dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR) or (vii) a combination of two or more isolated CDRs which may optionally be joined by a synthetic linker. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term “antigen-binding portion” of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies. Antigen-binding portions can be produced by recombinant DNA techniques, or by enzymatic or chemical cleavage of intact

immunoglobulins. Antibodies can be of different isotype, for example, an IgG (e.g., an IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 subtype), IgA1, IgA2, IgD, IgE, or IgM antibody.

The term “frameworks” refers to the art recognized portions of an antibody variable region that exist between the more divergent CDR regions. Such framework regions are typically referred to as frameworks 1 through 4 (FR1, FR2, FR3, and FR4) and provide a scaffold for holding, in three-dimensional space, the three CDRs found in a heavy or light chain antibody variable region, such that the CDRs can form an antigen-binding surface. Such frameworks can also be referred to as scaffolds as they provide support for the presentation of the more divergent CDRs. Other CDRs and frameworks of the immunoglobulin superfamily, such as ankyrin repeats and fibronectin, can be used as antigen binding molecules (see also, for example, U.S. Patent Nos. 6,300,064, 6,815,540 and U.S. Pub. No. 20040132028).

The term “epitope” or “antigenic determinant” refers to a site on an antigen to which an immunoglobulin or antibody specifically binds (e.g., TNF). An epitope typically includes at least 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15 amino acids in a unique spatial conformation. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

The terms “specific binding,” “selective binding,” “selectively binds,” and “specifically binds,” refer to antibody binding to an epitope on a predetermined antigen. Typically, the antibody binds with an affinity (K_D) of approximately less than 10^{-7} M, such as approximately less than 10^{-8} M, 10^{-9} M or 10^{-10} M or even lower, as determined using surface plasmon resonance (SPR) technology in a BIACORE instrument.

The term “ K_D ,” refers to the dissociation equilibrium constant of a particular antibody-antigen interaction. In certain embodiments, some antibodies of the invention bind to TNF with a dissociation equilibrium constant (K_D) of less than approximately 10^{-7} M, such as less than approximately 10^{-8} M, 10^{-9} M or 10^{-10} M or even lower, for example, as determined using surface plasmon resonance (SPR) technology in a BIACORE instrument.

As used herein, “identity” refers to the sequence matching between two polypeptides, molecules or between two nucleic acids. When a position in both of the two compared sequences is occupied by the same base or amino acid monomer subunit (for instance, if a position in each of the two DNA molecules is occupied by adenine, or a position in each of two polypeptides is occupied by a lysine), then the respective molecules are identical at that

position. The "percentage identity" between two sequences is a function of the number of matching positions shared by the two sequences divided by the number of positions compared x 100. For instance, if 6 of 10 of the positions in two sequences are matched, then the two sequences have 60% identity. By way of example, the DNA sequences CTGACT and CAGGTT share 50% identity (3 of the 6 total positions are matched). Generally, a comparison is made when two sequences are aligned to give maximum identity. Such alignment can be provided using, for instance, the method of Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implemented conveniently by computer programs such as the Align program (DNASTar, Inc.). The percent identity between two amino acid sequences can also be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

"Similar" sequences are those which, when aligned, share identical and similar amino acid residues, where similar residues are conservative substitutions for corresponding amino acid residues in an aligned reference sequence. In this regard, a "conservative substitution" of a residue in a reference sequence is a substitution by a residue that is physically or functionally similar to the corresponding reference residue, *e.g.*, that has a similar size, shape, electric charge, chemical properties, including the ability to form covalent or hydrogen bonds, or the like. Thus, a "conservative substitution modified" sequence is one that differs from a reference sequence or a wild-type sequence in that one or more conservative substitutions are present. The "percentage similarity" between two sequences is a function of the number of positions that contain matching residues or conservative substitutions shared by the two sequences divided by the number of positions compared x 100. For instance, if 6 of 10 of the positions in two sequences are matched and 2 of 10 positions contain conservative substitutions, then the two sequences have 80% positive similarity.

As used herein, the term "conservative sequence modifications" is intended to refer to amino acid modifications that do not negatively affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative sequence modifications

include nucleotide and amino acid substitutions, additions and deletions. For example, modifications can be introduced by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions include ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a particular antibody is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Methods of identifying nucleotide and amino acid conservative substitutions which do not eliminate antigen binding are well-known in the art (see, *e.g.*, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); and Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

"Amino acid consensus sequence" as used herein refers to an amino acid sequence that can be generated using a matrix of at least two, and preferably more, aligned amino acid sequences, and allowing for gaps in the alignment, such that it is possible to determine the most frequent amino acid residue at each position. The consensus sequence is that sequence which comprises the amino acids which are most frequently represented at each position. In the event that two or more amino acids are equally represented at a single position, the consensus sequence includes both or all of those amino acids.

The amino acid sequence of a protein can be analyzed at various levels. For example, conservation or variability can be exhibited at the single residue level, multiple residue level, multiple residue with gaps etc. Residues can exhibit conservation of the identical residue or can be conserved at the class level. Examples of amino acid classes include polar but uncharged R groups (Serine, Threonine, Asparagine and Glutamine); positively charged R groups (Lysine, Arginine, and Histidine); negatively charged R groups (Glutamic acid and Aspartic acid); hydrophobic R groups (Alanine, Isoleucine, Leucine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan, Valine and Tyrosine); and special amino acids (Cysteine, Glycine and Proline). Other classes are known to one of skill in the art and may be defined using structural determinations or other data to assess substitutability. In that sense, a

substitutable amino acid can refer to any amino acid which can be substituted and maintain functional conservation at that position.

It will be recognized, however, that amino acids of the same class may vary in degree by their biophysical properties. For example, it will be recognized that certain hydrophobic R groups (e.g., Alanine, Serine, or Threonine) are more hydrophilic (i.e., of higher hydrophilicity or lower hydrophobicity) than other hydrophobic R groups (e.g., Valine or Leucine). Relative hydrophilicity or hydrophobicity can be determined using art-recognized methods (see, e.g., Rose *et al.*, *Science*, 229: 834-838 (1985) and Cornette *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

As used herein, when one amino acid sequence (e.g., a first V_H or V_L sequence) is aligned with one or more additional amino acid sequences (e.g., one or more V_H or V_L sequences in a database), an amino acid position in one sequence (e.g., the first V_H or V_L sequence) can be compared to a “corresponding position” in the one or more additional amino acid sequences. As used herein, the “corresponding position” represents the equivalent position in the sequence(s) being compared when the sequences are optimally aligned, i.e., when the sequences are aligned to achieve the highest percent identity or percent similarity.

The term “nucleic acid molecule,” refers to DNA molecules and RNA molecules. A nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA. A nucleic acid is “operably linked” when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For instance, a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence. In certain embodiments, the invention provides isolated nucleic acid molecules that encode an antibody of the invention, a variable light chain of the invention, and/or a variable heavy chain of the invention. In certain embodiments, a nucleic acid molecule of the invention encodes: a polypeptide comprising a light chain variable region having at least 97% identity to SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 14; a polypeptide comprising a heavy chain variable region having at least 95% identity to SEQ ID NO: 5; or an antibody having at least 96% identity to SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 17.

The term “vector,” refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a “plasmid,” which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated.

Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome.

The term "host cell" refers to a cell into which an expression vector has been introduced. Host cells can include bacterial, microbial, plant or animal cells. Bacteria, which are susceptible to transformation, include members of the enterobacteriaceae, such as strains of *Escherichia coli* or *Salmonella*; Bacillaceae, such as *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, and *Haemophilus influenzae*. Suitable microbes include *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. Suitable animal host cell lines include CHO (Chinese Hamster Ovary lines) and NS0 cells.

The terms "treat," "treating," and "treatment," refer to therapeutic or preventative measures described herein. The methods of "treatment" employ administration to a subject, in need of such treatment, an antibody of the present invention, for example, a subject having a TNF α -mediated disorder or a subject who ultimately may acquire such a disorder, in order to prevent, cure, delay, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of the disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment.

The term "TNF-mediated disorder" refers generally to disease states and/or symptoms associated with TNF, including any disorder, the onset, progression or the persistence of the symptoms of which requires the participation of TNF. Examples of TNF-mediated disorders include, but are not limited to, age-related macular degeneration, neovascular glaucoma, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, retrolental fibroplasia, breast carcinomas, lung carcinomas, gastric carcinomas, esophageal carcinomas, colorectal carcinomas, liver carcinomas, ovarian carcinomas, the comas, arrhenoblastomas, cervical carcinomas, endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia, endometriosis, fibrosarcomas, choriocarcinoma, head and neck cancer, nasopharyngeal carcinoma, laryngeal carcinomas, hepatoblastoma, Kaposi's sarcoma, melanoma, skin carcinomas, hemangioma, cavernous hemangioma, hemangioblastoma, pancreas carcinomas, retinoblastoma, astrocytoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, medulloblastoma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, osteogenic sarcoma, leiomyosarcomas, urinary tract carcinomas, thyroid

carcinomas, Wilm's tumor, renal cell carcinoma, prostate carcinoma, abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema (such as that associated with brain tumors), Meigs' syndrome, rheumatoid arthritis, psoriasis and atherosclerosis. TNF-mediated disorders also include dry eye and TNF α -related inflammatory conditions, such as ocular inflammation, allergic conjunctivitis, dermatitis, rhinitis, and asthma, for example, and include those cellular changes resulting from the activity of TNF α that leads directly or indirectly to the TNF α -related inflammatory condition. In addition, TNF-mediated disorders also include ocular angiogenesis, Bechet's disease, retinitis, glaucoma, Sjögren syndrome, diabetic neuropathy, scleritis, keratitis and uveitis.

The term "effective dose" or "effective dosage" refers to an amount sufficient to achieve or at least partially achieve the desired effect. The term "therapeutically effective dose" is defined as an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications in a patient already suffering from the disease. Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disorder being treated and the general state of the patient's own immune system.

The term "subject" refers to any human or non-human animal. For example, the methods and compositions of the present invention can be used to treat a subject with a TNF-mediated disorder.

The numbering systems as used herein to identify amino acid residue positions in antibody heavy and light chain variable regions corresponds to the one as defined by A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670 (the AHo system). Conversion tables between the AHo system and the most commonly used system as defined by Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) are provided in A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

As used herein, the term "aggregation" refers to the process of intermolecular interactions/associations between monomeric molecules in liquid solution leading to the formation of oligomeric species. Aggregation can be evaluated under stress conditions using accelerated stability studies in a concentrated solution. Accelerated stability studies are designed to increase the rate of degradation, aggregation or chemical modifications of a compound by using extreme storage conditions. Accelerated stability studies, also known as stress studies, are typically performed at 40°C and room temperature. These stability studies

provide valuable information concerning the effect of exposure to environmental conditions outside of the normal label storage conditions, also known as stress conditions. High protein concentration solutions are widely used in the pharmaceutical industry. The solution behavior of proteins at high concentrations can be markedly different from that predicted based on dilute solution analysis due to thermodynamic non-ideality in these solutions. The non-ideality observed in these systems is related to the protein-protein interactions (PPI). Different types of forces play a key role in determining the overall nature and extent of these PPI and their relative contributions are affected by solute and solvent properties. The role of PPI is driven by these intermolecular forces to govern solution characteristics, including physical stability and protein self-association and aggregation. Concentrated solutions are those solutions where PPI affects the the proteins in solution by increasing the oligomerization rate. A concentrated solution can have, for example, a protein concentration of at least 10 mg/ml.

Soluble products of this process may be detected with analytical methods, such as SE-HPLC. The term "aggregation-reducing modification" as used herein refers to a modification, such as an amino acid substitution, that reduces an antibody's propensity to aggregate in a liquid solution compared with a parental antibody as described herein. A "parental" antibody is an antibody comprising essentially the same sequence as the corresponding antibody that has aggregation-reducing modifications. For example, the parental antibody may have the same CDRs as the modified antibody, and may have the exact same sequence as the modified antibody except for residues at AHo position 47 and/or 50 in the variable light chain sequence, and may further differ at AHo positions 12, 103, and 144 in the variable heavy chain sequence. Other differences may also be present, so long as the parental antibody does not contain the aggregation-reducing modifications present in the antibody modified according to a method of the invention.

The term "interface" as used herein refers to the interaction between the two variable domains (heavy and light variable domains) of an antibody. The interface includes the amino acid residues that participate directly or indirectly in the interaction between the variable domains. Such interaction includes, but is not limited to, all kinds of non-bonded interactions, for example van der Waals forces, hydrogen bonding, electrostatic terms, and hydrophobic interactions between the two domains.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention

belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections. It is understood that the various embodiments, preferences and ranges may be combined at will. Further, depending of the specific embodiment, selected definitions, embodiments or ranges may not apply.

In one aspect, the present invention provides antibodies that bind TNF α and thus are suitable to block the function of TNF α *in vivo*.

In certain embodiments, antibodies of the invention are optimized with an aggregation-reducing modification(s) relative to a parental antibody, such that an antibody of the invention has a reduced propensity to aggregate compared with a parental/unmodified antibody. Such modification(s) include amino acid substitutions of particular residues that participate in the variable light chain (VL) and variable heavy chain (VH) interface. In some embodiments, the aggregation-reducing modification comprises at least one amino acid substitution that reduces the free energy of the VL-VH interface compared with the free energy of the VL-VH interface of the parental antibody in an *in silico* modeling approach, as described herein. Such modifications include amino acid substitutions of particular residues that contribute to the free energy of the VL-VH interface.

In certain embodiments, an aggregation-reducing modification of the invention comprises a substitution at AHo position 50 in the VL chain. In one embodiment, the substitution is an arginine (R) at AHo position 50. In another embodiment, the arginine (R) at AHo position 50 replaces a lysine (K).

In other embodiments, an aggregation-reducing modification of the invention comprises a substitution at AHo position 47 in the VL chain. In one embodiment, the substitution is an arginine (R) at AHo position 47. In another embodiment, the arginine (R) at AHo position 47 replaces a lysine (K).

The AHo numbering system is described in detail in Honegger, A. and Plückthun, A. (2001) J Mol. Biol. 309:657-670). AHo position 50 in the variable light chain corresponds to Kabat position 42. AHo position 47 in the variable light chain corresponds to Kabat position

39. The Kabat numbering system is described further in Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).). Conversion tables between the AHo system and the most commonly used system as defined by Kabat et al are provided
 5 in A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

The following conversion tables are provided for two different numbering systems used to identify amino acid residue positions in antibody heavy and light chain variable regions. The Kabat numbering system is described further in Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). The AHo numbering system is
 10 described further in Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670).

Heavy Chain Variable Region Numbering

Table 1: Conversion table for the residue positions in the Heavy Chain Variable Domain

15

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

26	27	66	77	*	127
*	28	67	78	*	128
27	29	68	79	*	129
28	30	69	80	*	130
29	31	70	81	*	131
30	32	71	82	*	132
31	33	72	83	*	133
32	34	73	84	*	134
33	35	74	85	*	135
34	36	75	86	*	136
35	37	76	87	101	137
35a	38	77	88	102	138
35b	39	78	89	103	139
*	40	79	90	104	140
*	41	80	91	105	141
*	42	81	92	106	142
36	43	82	93	107	143
37	44	82a	94	108	144
38	45	82b	95	109	145
39	46	82b	96	110	146
40	47	83	97	111	147
41	48	84	98	112	148
42	49	85	99	113	149
43	50	86	100		

Column 1, Residue position in Kabat's numbering system. Column 2, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 1. Column 3, Residue position in Kabat's numbering system. Column 4, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 3. Column 5, Residue position in Kabat's numbering system. Column 6, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 5

Light Chain Variable Region Numbering

Table 2: Conversion table for the residue positions in the Light Chain Variable Domain

Kabat	AHO	Kabat	AHO	Kabat	AHO
1	1	43	51	83	101
2	2	44	52	84	102
3	3	45	53	85	103
4	4	46	54	86	104
5	5	47	55	87	105
6	6	48	56	88	106
7	7	49	57	89	107
8	8	50	58	90	108
9	9	*	59	91	109
10	10	*	60	92	110
11	11	*	61	93	111
12	12	*	62	94	112

13	13	*	63	95	113
14	14	*	64	95a	114
15	15	*	65	95b	115
16	16	*	66	95c	116
17	17	51	67	95d	117
18	18	52	68	95e	118
19	19	53	69	95f	119
20	20	54	70	*	120
21	21	55	71	*	121
22	22	56	72	*	122
23	23	57	73	*	123
24	24	58	74	*	124
25	25	59	75	*	125
26	26	60	76	*	126
27	27	61	77	*	127
*	28	62	78	*	128
27a	29	63	79	*	129
27b	30	64	80	*	130
27c	31	65	81	*	131
27d	32	66	82	*	132
27e	33	67	83	*	133
27f	34	68	84	*	134
*	35	*	85	*	135
28	36	*	86	*	136
29	37	69	87	96	137
30	38	70	88	97	138
31	39	71	89	98	139
32	40	72	90	99	140
33	41	73	91	100	141
34	42	74	92	101	142
35	43	75	93	102	143
36	44	76	94	103	144
37	45	77	95	104	145
38	46	78	96	105	146
39	47	79	97	106	147
40	48	80	98	107	148
41	49	81	99	108	149
42	50	82	100		

Column 1, Residue position in Kabat's numbering system. Column 2, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 1. Column 3, Residue position in Kabat's numbering system. Column 4, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 3. Column 5, Residue position in Kabat's numbering system. Column 6, Corresponding number in AHO's numbering system for the position indicated in column 5

The antibodies of the invention can comprise additional modifications as desired. For example, an antibody of the invention can comprise amino acid substitutions to reduce its immunogenicity *in vivo* according to the methods described, for example, in US Patent Application No. 12/973,968 and/or substitutions for enhancing the solubility of the antibody, as described in WO 09/155725. Thus, in one embodiment, an antibody of the invention comprises Serine (S) at heavy chain position 12 (AHO numbering); Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain position 103 (AHO numbering) and/or Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain position 144 (AHO numbering). Additionally, the antibody can comprise Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain positions 97, 98 and/or 99 (AHO numbering). Preferably, the antibody comprises Serine (S) at heavy chain position 12 (AHO numbering), Threonine (T) at heavy chain position 103 (AHO numbering) and Threonine (T) at heavy chain position 144 (AHO numbering).

In one embodiment, an antibody of the invention comprises the variable light chain:

SEQ ID NO: 1

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGRAPKLLIY(X)_{n=1-50}
GVPSRFGSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTLKLVLG

In a preferred embodiment, an antibody of the invention comprises the variable light chain (the CDRs are underlined):

SEQ ID NO: 2:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFGSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTLKLVLG

In another embodiment, an antibody of the invention comprises the variable heavy chain:

SEQ ID NO. 3: variable heavy chain framework

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

In still another embodiment, an antibody of the invention comprises the variable heavy chain framework

SEQ ID NO: 4: variable heavy chain framework

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

In a preferred embodiment, the antibody of the invention comprises the variable heavy chain (the CDRs are underlined):

10

SEQ ID NO: 5:

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYGDND
ITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLWGQG
15 TTVTVSS

15

As used herein, X residues are CDR insertion sites. X may be any naturally occurring amino acid; at least three and up to 50 amino acids can be present.

In one embodiment, the variable light chain framework of an antibody of the invention comprises SEQ ID NO: 1 and the variable heavy chain framework comprises SEQ
20 ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4.

In another embodiment, the variable light chain framework of an antibody of the invention comprises a sequence having at least 65% identity, more preferably at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% identity, to SEQ ID NO: 1. Most preferably said sequence has an arginine (R) at AHo position 50. In another embodiment, said
25 sequence has an arginine (R) at AHo position 47.

In another embodiment, the variable heavy chain framework of an antibody of the invention comprises a sequence having at least 80% identity, more preferably at least 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% identity, to SEQ ID No. 3. Preferably, said antibody comprises Serine (S) at heavy chain position 12 (AHo numbering), Threonine (T) at heavy chain position 103 (AHo numbering) and Threonine (T)
30 at heavy chain position 144 (AHo numbering).

In another embodiment, the variable light chain framework of an antibody of the invention comprises a sequence having at least 97%, 98%, more preferably 99% identity, to SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 14.

5 In another embodiment, the variable heavy chain framework of an antibody of the invention comprises a sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% identity, to SEQ ID NO: 5.

In another embodiment, an antibody of the invention comprises a sequence having at least 96%, 97%, 98%, more preferably 99% identity, to SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 17.

10 In another embodiment, the variable light chain framework of an antibody of the invention comprises SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 14, and the variable heavy chain framework comprises SEQ ID NO: 5.

In one embodiment, antibodies and antibody fragments of the present invention are single-chain antibodies (scFv) or Fab fragments. In the case of scFv antibodies, a VL domain can be linked to a VH domain in either orientation by a flexible linker. A suitable state of the art linker consists of repeated GGGGS (SEQ ID NO: 6) amino acid sequences or variants thereof. In a preferred embodiment of the present invention a (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 7) linker or its derivative is used, but variants of 1-3 repeats are also possible (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). Other linkers that can be used for the present invention are described by Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 and Roovers et al. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59. The arrangement can be either VL-linker-VH or VH-linker-VL, with the former orientation being the preferred one. In the case of Fab fragments, selected light chain variable domains VL are fused to the constant region of a human Ig kappa chain, while 25 the suitable heavy chain variable domains VH are fused to the first (N-terminal) constant domain CH1 of a human IgG. At the C-terminus, an inter-chain disulfide bridge is formed between the two constant domains.

Thus, in one embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

30 SEQ ID NO: 8

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50}WYQQKPGRAPKLLIY (X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG (X)_{n=1-50}RFTISRDTSKNTVYLQMNS
 5 LRAEDTAVYYCAR (X)_{n=1-50}WGQGTLLTVSS

In another embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

SEQ ID NO: 9

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY (X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS (X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG (X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTVYLQMNSLR
 AEDTAVYYCAR (X)_{n=1-50}WGQGTLLTVSS

15 In a preferred embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

SEQ ID NO: 10

(34rFW1.4_VL_K50R_DHP):

20 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLA
 SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFIGQGTKLTVLGGG
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRYSYWICWVR
 QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATY
 YCARLGYADYAYDLWGQGTITVTVSS

25 In one embodiment, an antibody of the invention comprises the variable light chain:

SEQ ID NO. 11: variable light chain framework of FW1.4 (KI27)

30 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY (X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

In another embodiment, an antibody of the invention comprises the variable light chain:

SEQ ID NO. 12: substituted variable light chain framework of FW1.4

5 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY (X)_{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

In still another preferred embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

10

SEQ ID NO: 13

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50} WYQQRPGKAPKLLIY (X)_{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

15

In another embodiment, an antibody of the invention comprises the variable light chain (the CDRs are underlined):

SEQ ID NO: 14:

20

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC QSSQSVYGNIWMA WYQQRPGKAPKLLIY QASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYC QGNFNTGDRYA FGQGTKLTVL

Thus, in one embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

SEQ ID NO: 15:

25

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC (X)_{n=1-50} WYQQRPGKAPKLLIY (X)_{n=1-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (X)_{n=1-50}
WVRQAPGKGLEWVG (X)_{n=1-50} RFTISRDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCAR (X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

In another embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

SEQ ID NO: 16:

5 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTVYLMNSLR
 AEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGLTVTVSS

In one embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence:

SEQ ID NO: 17

(34rFW1.4_VL_K47R_DHP):

15 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIMAWYQQRPGKAPKLLIYQASKLA
 SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
 GSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVR
 QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTATY
 20 YCARLGYADYAYDLWGQGTITVTVSS

In yet another embodiment, an antibody of the invention comprises the sequence: SEQ
 ID NO: 18

(34rFW1.4)

25 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIMAWYQQRPGKAPKLLIYQASKLA
 SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
 GSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVR
 QAPGKGLEWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTATY
 30 YCARLGYADYAYDLWGQGTITVTVSS

In one embodiment, the VL of a parental antibody is or comprises SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 12 or a sequence having at least 65% identity, more preferably, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 12. In another preferred embodiment, the VH of the parental antibody is or comprises SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4 a sequence having at least 80% identity, more preferably, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4.

An antibody of the invention that comprises an aggregation-reducing modification preferably comprises one or more CDRs from a rabbit antibody. As known in the art, rabbit CDRs are different from human or rodent CDRs: they can contain cysteine residues that become disulphide linked to the framework or form interCDR S-S bridges. Moreover, rabbit CDRs often do not belong to any previously known canonical structure.

The present invention also features bivalent and bispecific molecules comprising an anti-TNF α antibody, or a fragment thereof, of the invention. An antibody of the invention, or antigen-binding portions thereof, can be derivatized or linked to another functional molecule, *e.g.*, another peptide or protein (*e.g.*, another antibody or ligand for a receptor) to generate a bispecific molecule that binds to at least two different binding sites or target molecules. The antibody of the invention may be derivatized or linked to more than one other functional molecule to generate multispecific molecules that bind to more than two different binding sites and/or target molecules; such multispecific molecules are also intended to be encompassed by the term "bispecific molecule" as used herein. Non-limiting examples of bispecific molecules include a diabody, a single-chain diabody, and a tandem antibody, as known to those of skill in the art.

To create a bispecific molecule of the invention, an antibody of the invention can be functionally linked (*e.g.*, by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other binding molecules, such as another antibody, antibody fragment, tumor specific or pathogen specific antigens, peptide or binding mimetic, such that a bispecific molecule results. Accordingly, the present invention includes bispecific molecules comprising at least one first binding molecule having specificity for TNF α and a second binding molecule having specificity for one or more additional target epitope.

In one embodiment, the bispecific molecules of the invention comprise a binding specificity at least one antibody, or an antibody fragment thereof, including, *e.g.*, an Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, or a single chain Fv. The antibody may also be a light chain or heavy chain dimer, or any minimal fragment thereof such as a Fv or a single chain construct as described

in Ladner *et al.* U.S. Patent No. 4,946,778, the contents of which are expressly incorporated by reference.

While human monoclonal antibodies are preferred, other antibodies which can be employed in the bispecific molecules of the invention are murine, chimeric and humanized monoclonal antibodies.

The bispecific molecules of the present invention can be prepared by conjugating the constituent binding specificities using methods known in the art. For example, each binding specificity of the bispecific molecule can be generated separately and then conjugated to one another. When the binding specificities are proteins or peptides, a variety of coupling or cross-linking agents can be used for covalent conjugation. Examples of cross-linking agents include protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-phenylenedimaleimide (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), and sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) (see *e.g.*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Other methods include those described in Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83), and Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Preferred conjugating agents are SATA and sulfo-SMCC, both available from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

When the binding specificities are antibodies, they can be conjugated via sulfhydryl bonding, for example, via the C-terminus hinge regions of the two heavy chains or other sites, whether naturally occurring or introduced artificially. In a particularly preferred embodiment, the hinge region is modified to contain an odd number of sulfhydryl residues, preferably one, prior to conjugation.

Alternatively, both binding specificities can be encoded in the same vector and expressed and assembled in the same host cell. This method is particularly useful where the bispecific molecule is a mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ or ligand x Fab fusion protein. A bispecific molecule of the invention can be a single chain molecule comprising one single chain antibody and a binding determinant, or a single chain bispecific molecule comprising two binding determinants. Bispecific molecules may comprise at least two single chain molecules. Further, a bispecific molecule may be a scFv that specifically binds to first target, wherein the VH and VL of said scFv are linked with a flexible linker comprising a domain providing specific binding to a second target. Suitable linkers are described, for

example, in International Patent Application WO 2010/006454. Methods for preparing bispecific molecules are described for example in U.S. Patent Number 5,260,203; U.S. Patent Number 5,455,030; U.S. Patent Number 4,881,175; U.S. Patent Number 5,132,405; U.S. Patent Number 5,091,513; U.S. Patent Number 5,476,786; U.S. Patent Number 5,013,653; U.S. Patent Number 5,258,498; and U.S. Patent Number 5,482,858.

Binding of the bispecific molecules to their specific targets can be confirmed by, for example, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), FACS analysis, bioassay (e.g., growth inhibition), or by immunoblot assay. Each of these assays generally detects the presence of protein-antibody complexes of particular interest by employing a labeled reagent (e.g., an antibody) specific for the complex of interest. For example, the TNF-antibody complexes can be detected using e.g., an enzyme-linked antibody or antibody fragment which recognizes and specifically binds to the antibody-TNF complexes. Alternatively, the complexes can be detected using any of a variety of other immunoassays. For example, the antibody can be radioactively labeled and used in a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, which is incorporated by reference herein). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a γ counter or a scintillation counter or by autoradiography.

In another aspect, the invention provides a method for producing the antibodies described herein. The methods for producing antibodies having reduced propensity for aggregating in solution as provided herein are based on the surprising observation that through modulation of the antibody domain interaction between the light chain and heavy chain, aggregation propensity of antibodies can be reduced, and that aggregation-reducing mutations can be reliably predicted by determining the free energy of the VL/VH interface defined as the difference between the energy of the antibody (such as an scFv) and the individual variable domains. As shown herein, aggregation-reducing substitutions that modulate antibody domain interaction by lowering the free energy between the variable domains can be made without affecting stability or binding activity of the antibody.

In one embodiment, a method of the invention comprises the steps of:

- (i) providing an antibody comprising a variable light chain (VL) and a variable heavy chain (VH);

- (ii) identifying one or more residue position participating in the interface between the variable light chain (VL) and the variable heavy chain (VH) of the antibody; and
- (iii) modifying the antibody by introducing a substitution at the identified residue position(s) such that the substitution(s) reduces the free energy between the VL and the VH domains by at least 0.5 kcal/mol, preferably at least 1.0 kcal/mol, and most preferably at least 2.0 kcal/mol (*i.e.*, the free energy between the VL and VH domains with the substitution is at least 0.5 kcal/mol less than the free energy between the corresponding VL and VH domains that do not comprise the amino acid substitution), thereby reducing the aggregation propensity of the modified antibody compared with that of a parental antibody.

As outlined above, the antibody can be, for example, a Fab, Fab', a F(ab)'2, single-chain Fv (scFv), an Fv fragment, a diabody, a single-chain diabody, a tandem antibody, or a linear antibody; in a preferred embodiment, the antibody is a single-chain Fv (scFv).

In a preferred embodiment, the identification of the one or more residue positions participating in the interface between the variable light chain and the variable heavy chain of the antibody (*i.e.* step (ii)) involves the determination of the free energy between the VL –VH interface. This can be performed by using commonly known bioinformatic programs. One example of a suitable bioinformatic program is CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics).

For the purpose of determining the free energy between the VL –VH interface, typically, a full atomistic molecular presentation of the protein is provided. The free energy of the interface is the energy difference between the entire antibody comprising both variable domains VL and VH and the sum of the energies of the individual domains in the context of an implicit solvent method. This involves three single energy calculations, (1) on the antibody G(a); (2) on the VL G(b); and (3) on the VH G(c). Accordingly, the free energy of the interface is

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

In one embodiment, the implicit solvent method is GBMV or PBSA as known in the art.

The free energy determination may further comprise the step of simulating the charge distribution of the protein. Said charge distribution can be simulated based on electrostatic or van der Waals forces.

To determine a suitable modification, one or more amino acid residues participating in the interface can be chosen for substitution. For example, a molecular model of the protein comprising the one or more substitutions (*e.g.*, changing one or more residues to alanine) at the selected positions is generated and the free energy of the interface of the substituted molecular presentation is determined. If the free energy of the interface of the substituted molecular model is lower than the free energy of the interface of the initial molecular model, the amino acid residue is selected for substitution. Within the context of CHARMM, mutations can be constructed, for example, with the Build Mutants protocol. The one or more substitutions in the molecular model can be at positions that are known or suspected to be involved in the VL/VH interface.

In one embodiment, an additional step of energy minimization of the molecular model comprising the one or more substitutions at the selected position(s) in the area around the mutation(s) is performed. Said area can be set to 10 Angstroms.

In one embodiment, a residue position identified for substitution is occupied by a charged amino acid.

An antibody produced by a method of the invention can comprise any suitable variable light chain or heavy chain as known in the art, and preferably comprises at least one CDR from a rabbit antibody. Certain preferred variable light and heavy chains are described herein. For example, an antibody of the invention can comprise: a VL antibody framework having at least 65% identity, more preferably 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 12, further comprising arginine (R) at AHo position 47 and/or at AHo position 50 of the variable light chain; and a VH antibody framework having at least 80% identity, more preferably, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 3.

The modification of the one or more residue positions is preferably done according to the teachings of PCT/CH2008/000285, which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, for a given antibody subtype, certain amino acids are present at specific residue positions of the antibody framework. For example,

a) for a human VH3 family heavy chain variable region, the preferred amino acids are:

(i) glutamine (Q) at amino acid position 1 using AHo or Kabat numbering system;

(ii) glutamine (Q) at amino acid position 6 using AHo or Kabat numbering system;

(iii) threonine (T) or alanine (A) at amino acid position 7 using AHo or Kabat numbering system;

5 (iv) alanine (A), valine (V), or phenylalanine (F) at amino acid position 89 using AHo numbering system (amino acid position 78 using Kabat numbering system); and/or

(v) arginine (R), glutamine (Q), isoleucine (I), leucine (L), methionine (M) or phenylalanine (F) at amino acid position 103 using AHo numbering system (amino acid position 89 using Kabat numbering);

10 b) for a human VH1a family heavy chain variable region, the preferred amino acids are:

(i) glutamic acid (E) at amino acid position 1 using AHo or Kabat numbering system;

15 (ii) glutamic acid (E) at amino acid position 6 using AHo or Kabat numbering system;

(iii) leucine (L) at amino acid position 12 using AHo numbering system (amino acid position 11 using Kabat numbering system);

(iv) methionine (M) at amino acid position 13 using AHo numbering system (amino acid position 12 using Kabat numbering system):

20 (v) glutamic acid (E) or glutamine (Q) at amino acid position 14 using AHo numbering system (amino acid position 13 using Kabat numbering system);

(vi) leucine (L) at amino acid position 19 using AHo numbering system (amino acid position 18 using Kabat numbering system);

25 (vii) isoleucine (I) at amino acid position 21 using AHo numbering system (amino acid position 20 using Kabat numbering system);

(viii) phenylalanine (F), serine (S), histidine (H) or aspartic acid (D) at amino acid position 90 using AHo numbering system (amino acid position 79 using Kabat numbering system);

30 (ix) aspartic acid (D) or glutamine (Q) at amino acid position 92 using AHo numbering system (amino acid position 81 using Kabat numbering system);

(x) glycine (G), asparagine (N) or threonine (T) at amino acid position 95 using AHo numbering system (amino acid position 82b using Kabat numbering system); and/or

(xi) threonine (T), alanine (A), proline (P) or phenylalanine (F) at amino acid position 98 using AHo numbering system (amino acid position 84 using Kabat numbering system);

c) for a human VH1b family heavy chain variable region, preferred amino acids are:

(i) glutamic acid (E) at amino acid position 1 using AHo or Kabat numbering system;

(ii) threonine (T), proline (P), valine (V) or aspartic acid (D) at amino acid position 10 using AHo numbering system (amino acid position 9 using Kabat numbering system);

(iii) leucine (L) at amino acid position 12 using AHo numbering system (amino acid position 11 using Kabat numbering system);

(iv) valine (V), arginine (R), glutamine (Q) or methionine (M) at amino acid position 13 using AHo numbering system (amino acid position 12 using Kabat numbering system);

(v) glutamic acid (E), arginine (R) or methionine (M) at amino acid position 14 using AHo numbering system (amino acid position 13 using Kabat numbering system);

(vi) arginine (R), threonine (T), or asparagine (N) at amino acid position 20 using AHo numbering system (amino acid position 19 using Kabat numbering system);

(vii) isoleucine (I), phenylalanine (F), or leucine (L) at amino acid position 21 using AHo numbering system (amino acid position 20 using Kabat numbering system);

(viii) lysine (K) at amino acid position 45 using AHo numbering system (amino acid position 38 using Kabat numbering system);

(ix) threonine (T), proline (P), valine (V) or arginine (R) at amino acid position 47 using AHo numbering system (amino acid position 40 using Kabat numbering system);

(x) lysine (K), histidine (H) or glutamic acid (E) at amino acid position 50 using AHo numbering system (amino acid position 43 using Kabat numbering system);

5 (xi) isoleucine (I) at amino acid position 55 using AHo numbering (amino acid position 48 using Kabat numbering);

(xii) lysine (K) at amino acid position 77 using AHo numbering (amino acid position 66 using Kabat numbering);

(xiii) alanine (A), leucine (L) or isoleucine (I) at amino acid position 78 using AHo numbering system (amino acid position 67 using Kabat numbering system);

10 (xiv) glutamic acid (E), threonine (T) or alanine (A) at amino acid position 82 using AHo numbering system (amino acid position 71 using Kabat numbering system);

(xv) threonine (T), serine (S) or leucine (L) at amino acid position 86 using AHo numbering system (amino acid position 75 using Kabat numbering system);

15 (xvi) aspartic acid (D), asparagine (N) or glycine (G) at amino acid position 87 using AHo numbering system (amino acid position 76 using Kabat numbering system); and/or

(xvii) asparagine (N) or serine (S) at amino acid position 107 using AHo numbering system (amino acid position 93 using Kabat numbering system);

20 d) for a human Vkappa1 family light chain variable region, preferred amino acids are:

(i) glutamic acid (E) or isoleucine (I) at amino acid position 1 using AHo or Kabat numbering system;

(ii) valine (V) or isoleucine (I) at amino acid position 3 using AHo or Kabat numbering system;

25 (iii) valine (V), leucine (L) or isoleucine (I) at amino acid position 4 using AHo or Kabat numbering system;

(iv) glutamine (Q) at amino acid position 24 using AHo or Kabat numbering system;

30 (v) arginine (R) or isoleucine (I) at amino acid position 47 using AHo numbering system (amino acid position 39 using Kabat numbering system);

(vi) arginine (R), glutamic acid (E) threonine (T), methionine (M) or glutamine (Q) at amino acid position 50 using AHO numbering system (amino acid position 42 using Kabat numbering system);

(vii) histidine (H), serine (S) or phenylalanine (F) at amino acid position 57 using AHO numbering system (amino acid position 49 using Kabat numbering system);

(viii) phenylalanine (F) at amino acid position 91 using AHO numbering system (amino acid position 73 using Kabat numbering system); and/or

(ix) valine (V), serine (S), glycine (G) or isoleucine (I) at amino acid position 103 using AHO numbering system (amino acid position 85 using Kabat numbering system);

e) for a human Vkappa3 family light chain variable region, the preferred amino acids are:

(i) threonine (T) at amino acid position 2 using AHO or Kabat numbering system;

(ii) threonine (T) at amino acid position 3 using AHO or Kabat numbering system;

(iii) isoleucine (I) at amino acid position 10 using AHO or Kabat numbering system;

(iv) tyrosine (Y) at amino acid position 12 using AHO or Kabat numbering system;

(v) serine (S) at amino acid position 18 using AHO or Kabat numbering system;

(vi) alanine (A) at amino acid position 20 using AHO or Kabat numbering system;

(vii) methionine (M) at amino acid position 56 using AHO numbering system (amino acid position 48 using Kabat numbering system);

(viii) valine (V) or threonine (T) at amino acid position 74 using AHO numbering system (amino acid position 58 using Kabat numbering system);

(ix) asparagine (N) at amino acid position 94 using AHO numbering system (amino acid position 76 using Kabat numbering system);

(x) tyrosine (Y) or serine (S) at amino acid position 101 using AHO numbering system (amino acid position 83 using Kabat numbering system); and/or

(xi) leucine (L) or alanine (A) at amino acid position 103 using AHO numbering (amino acid position 85 using Kabat numbering);

5 f) for a human Vlambda1 family light chain variable region, preferred amino acids are:

(i) leucine (L), serine (S) or glutamic acid (E) at amino acid position 1 using AHO or Kabat numbering system;

(ii) alanine (A), proline (P), isoleucine (I) or tyrosine (Y) at amino acid position 2 using AHO or Kabat numbering system;

10 (iii) valine (V) or methionine (M) at amino acid position 4 using AHO or Kabat numbering system;

(iv) glutamic acid (E) at amino acid position 7 using AHO or Kabat numbering system;

15 (v) alanine (A) at amino acid position 11 using AHO or Kabat numbering system;

(vi) threonine (T) or serine (S) at amino acid position 14 using AHO or Kabat numbering system;

(vii) histidine (H) at amino acid position 46 using AHO numbering system (amino acid position 38 using Kabat numbering system);

20 (viii) threonine (T), serine (S), asparagine (N), glutamine (Q) or proline (P) at amino acid position 53 using AHO numbering system (amino acid position 45 using Kabat numbering system);

(ix) arginine (R) or glutamine (Q) at amino acid position 82 using AHO numbering system (amino acid position 66 using Kabat numbering system);

25 (x) glycine (G), threonine (T) or aspartic acid (D) at amino acid position 92 using AHO numbering system (amino acid position 74 using Kabat numbering system); and/or

(xi) valine (V), threonine (T), histidine (H) or glutamic acid (E) at amino acid position 103 using AHO numbering (amino acid position 85 using Kabat numbering).

Accordingly, substitutions made in the present method preferably follow the teachings of PCT/CH2008/000285. The subtype determination is known to the person skilled in the art.

In one embodiment, a method of the invention comprises modification of an antibody at AHo position 47 and/or 50 of the variable light chain, in particular of a Vkappa1 variable light chain. Preferably, the antibody is modified to comprise arginine (R) at AHo position 47 and/or at AHo position 50 of the variable light chain. In some embodiments, lysine (K) is substituted by arginine (R) at AHo position 47 and/or AHo position 50 of the variable light chain. As the antibodies of the invention can comprise additional modifications as desired, the methods of the invention can comprise the further step of modifying the antibody such as to comprise Serine (S) at heavy chain position 12 (AHo numbering); Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain position 103 (AHo numbering) and/or Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain position 144 (AHo numbering). Additionally, the antibody can be modified to comprise Serine (S) or Threonine (T) at heavy chain positions 97, 98 and/or 99 (AHo numbering). Preferably, the method comprises the step of modifying the antibody to comprise Serine (S) at heavy chain position 12 (AHo numbering), Threonine (T) at heavy chain position 103 (AHo numbering) and Threonine (T) at heavy chain position 144 (AHo numbering).

The invention further provides a method of generating a humanized antibody with a low propensity for aggregating in solution, the method comprising selecting a variable light chain framework that comprises arginine (R) at AHo position 47 and/or at AHo position 50. The method may further comprise selecting a variable heavy chain framework that comprises a serine (S) at heavy chain position 12 (AHo numbering); serine (S) or threonine (T) at heavy chain position 103 (AHo numbering) and/or serine (S) or threonine (T) at heavy chain position 144 (AHo numbering). In one embodiment, a framework identified based on a chosen selection criteria may be further modified with an aggregation-reducing modification of the invention. For example, if a variable light chain framework is identified that has an arginine (R) at position 50, the residue at AHo position may be substituted with a different amino acid, such as arginine (R), or if a variable heavy chain is identified that has a serine (S) at AHo position 12, the residues at AHo positions 103 and 144 may be substituted with threonines.

As used herein, a "humanized" antibody is an antibody that comprises non-human CDRs and human or human-derived variable heavy and/or human or human-derived variable light chain framework sequences. Humanization of antibodies is well known in the art. In

one embodiment, the humanized antibody comprises at least one, and preferably six, CDRs from an antibody produced in a rabbit or selected from a CDR library.

The variable antibody frameworks can be selected, for example, from a database (such as the Kabat database, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>), The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest (<http://www.kabatdatabase.com/index.html>), the Universal Protein Resource (UniProt; <http://pir.georgetown.edu/>), and Abysis Database (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), based on identity and/or similarity with the variable framework sequences of the antibody from which the CDRs originated, or based on otherwise preferred framework sequence(s).

Various computer programs are available for searching suitable human framework sequences that meet the selected requirement(s). For example, "KabatMan" is a computer-searchable version of the Kabat antibody sequence data from the *Sequences of Immunological Interest* book. The KabatMan program is described in the paper: Martin (1996) Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **25**, 130-133, and is available at <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>, and <http://www.bioinf.org.uk/abs/kabatman.html>. The Abysis database, at <http://www.bioinf.org.uk/abysis/>, integrates sequence data from Kabat, IMGT and the PDB with structural data from the PDB. It provides a comprehensive point-and-click interface which allows one to search the sequence data on various criteria and display results in different formats. For data from the PDB, sequence searches can be combined with structural constraints.

In another aspect, the invention provides an antibody generated by the method disclosed herein. In a preferred embodiment, said antibody comprises a VL antibody framework having at least 80% identity, more preferably 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13; preferably, the antibody comprises arginine (R) at AHo position 47 and/or at AHo position 50 of the variable light chain.

Additionally or alternatively, the VH antibody framework is or comprises SEQ ID NO: 3 or a sequence having at least 80% identity, more preferably, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, more preferably 99% to SEQ ID NO: 3.

In certain embodiments, the invention further provides:

(1) A method for reducing the aggregation propensity of an antibody being a heterodimeric complex that comprises heavy and light variable domains, the method comprising the steps of:

(a) providing a full atomistic molecular presentation of the antibody;

(b) determining the free energy of the interface between both domains;

(c) choosing one or more amino acid residues participating in the interface for substitution by providing a molecular model of the antibody comprising the one or more substitutions at the selected positions and determining the free energy of the interface of the substituted molecular presentation;

(d) selecting an amino acid residue for substitution if the free energy of the interface of the substituted molecular model is lower than the free energy of the interface of the initial molecular model;

(2) A method of (1), wherein the free energy of the interface is determined by calculating the energy difference between the complex and the sum of the energies of the individual domains in the context of an implicit solvent method;

(3) The method of (2), wherein the solvent is GBMV or PBSA;

(4) The method of anyone of the preceding (1)-(3), further comprising the step of

(i) simulating the charge distribution of the protein, wherein said step is performed within step a and b;

(5) The method of (4), wherein the charge distribution is simulated based on electrostatic or van der Waals forces;

(6) The method of anyone of the preceding (1)-(5), wherein step (c) comprises the additional step of energy minimization in the area around the mutation;

(7) The method of anyone of the preceding (1)-(7), wherein the antibody is a single chain variable fragment (scFv).

Antibodies of the invention may be generated using routine techniques in the field of recombinant genetics. Knowing the sequences of the polypeptides, the cDNAs encoding them can be generated by gene synthesis by methods well known in the art. These cDNAs can be cloned into suitable vector plasmids.

Standard cloning and mutagenesis techniques well known to the person skilled in the art can be used to attach linkers, shuffle domains or construct fusions for the production of Fab fragments. Basic protocols disclosing the general methods of this invention are described

in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 3rd ed. 2001) and in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1999).

5 The DNA sequence harboring a gene encoding a scFv polypeptide, or in the case of Fab fragments, encoding either two separate genes or a bi-cistronic operon comprising the two genes for the VL-C κ and the VH-CH1 fusions are cloned in a suitable expression vector, preferably one with an inducible promoter. Care must be taken that in front of each gene an appropriate ribosome binding site is present that ensures translation. It is to be understood that the antibodies of the present invention comprise the disclosed sequences rather than they consist of them. For example, cloning strategies may require that a construct is made from 10 which an antibody with one or a few additional residues at the N-terminal end are present. Specifically, the methionine derived from the start codon may be present in the final protein in cases where it has not been cleaved posttranslationally. Most of the constructs for scFv antibodies give rise to an additional alanine at the N-terminal end. In a preferred embodiment of the present invention, an expression vector for periplasmic expression in *E. coli* is chosen 15 (Krebber, 1997). Said vector comprises a promoter in front of a cleavable signal sequence. The coding sequence for the antibody peptide is then fused in frame to the cleavable signal sequence. This allows the targeting of the expressed polypeptide to the bacterial periplasm where the signal sequence is cleaved. The antibody is then folded. In the case of the Fab fragments, both the VL-C κ and the VH-CH1 fusions peptides must be linked to an export 20 signal. The covalent S-S bond is formed at the C-terminal cysteines after the peptides have reached the periplasm. If cytoplasmic expression of antibodies is preferred, said antibodies usually can be obtained at high yields from inclusion bodies, which can be easily separated from other cellular fragments and protein. In this case the inclusion bodies are solubilized in a denaturing agent such as e.g. guanidine hydrochloride (GndHCl) and then refolded by 25 renaturation procedures well known to those skilled in the art.

Plasmids expressing the scFv or Fab polypeptides are introduced into a suitable host, preferably a bacterial, yeast or mammalian cell, most preferably a suitable *E. coli* strain as for example JM83 for periplasmic expression or BL21 for expression in inclusion bodies. The polypeptide can be harvested either from the periplasm or from inclusion bodies and purified 30 using standard techniques such as ion exchange chromatography, reversed phase chromatography, affinity chromatography and/or gel filtration known to the person skilled in the art.

Antibodies of the invention can be characterized with respect to yield, solubility and stability *in vitro*. For example, binding capacities towards TNF, preferably towards human TNF α , can be tested *in vitro* by ELISA or surface plasmon resonance (BIACore), using recombinant human TNF as described in WO9729131, the latter method also allowing to
5 determine the k_{off} rate constant, which should preferably be less than 10^{-3}s^{-1} . K_d values of ≤ 10 nM are preferred.

In one embodiment, the present invention provides antibodies that bind TNF α and thus are suitable to block the function of TNF α *in vivo*. In a particular embodiment, the anti-TNF α antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 17.

10 For therapeutic applications, anti-TNF antibodies of the invention are administered to a mammal, preferably a human, in a pharmaceutically acceptable dosage form such as those discussed above, including those that may be administered to a human intravenously as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intra-cerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical,
15 intraocular, intranasal, otic, sublingual, transdermal, or inhalation routes, for example. The antibodies also are suitably administered by intra tumoral, peritumoral, intralesional, or perilesional routes, to exert local as well as systemic therapeutic effects.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the
20 disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

Anti-TNF antibodies of the invention are useful in the treatment of TNF-mediated
25 diseases. Depending on the type and severity of the disease, about 1 $\mu\text{g/kg}$ to about 50 mg/kg (e.g., 0.1-20 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily or weekly dosage might range from about 1 $\mu\text{g/kg}$ to about 20 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over
30 several days or longer, depending on the condition, the treatment is repeated until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful.

The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays, including, for example, radiographic tumor imaging.

According to another embodiment of the invention, the effectiveness of the antibody in preventing or treating disease may be improved by administering the antibody serially or in combination with another agent that is effective for those purposes, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), an antibody capable of inhibiting or neutralizing the angiogenic activity of acidic or basic fibroblast growth factor (FGF) or hepatocyte growth factor (HGF), an antibody capable of inhibiting or neutralizing the coagulant activities of tissue factor, protein C, or protein S (see Esmon et al., PCT Patent Publication No. WO 91/01753, published 21 Feb. 1991), an antibody capable of binding to HER2 receptor (see Hudziak et al., PCT Patent Publication No. WO 89/06692, published 27 Jul. 1989), or one or more conventional therapeutic agents such as, for example, alkylating agents, folic acid antagonists, anti-metabolites of nucleic acid metabolism, antibiotics, pyrimidine analogs, 5-fluorouracil, cisplatin, purine nucleosides, amines, amino acids, triazol nucleosides, or corticosteroids. Such other agents may be present in the composition being administered or may be administered separately. Also, the antibody is suitably administered serially or in combination with radiological treatments, whether involving irradiation or administration of radioactive substances.

Antibodies of the invention may be used as affinity purification agents. In this process, the antibodies are immobilized on a solid phase such a Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody is contacted with a sample containing a target protein (or fragment thereof) that the antibody binds, such as TNF in the case of anti-TNF α antibodies, to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the target protein, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent, such as glycine buffer, pH 5.0, that will release the target protein from the antibody.

Antibodies may also be useful in diagnostic assays for a target protein, e.g., detecting its expression in specific cells, tissues, or serum. Such diagnostic methods may be useful in cancer diagnosis.

For diagnostic applications, the antibody typically will be labeled with a detectable moiety. Numerous labels are available which can be generally grouped into the following categories:

(a) Radioisotopes, such as ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P or ^{35}S . The antibody
5 can be labeled with the radioisotope using the techniques described in Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) for example and radioactivity can be measured using scintillation counting.

(b) Fluorescent labels such as rare earth chelates (europium chelates) or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, Lissamine, phycoerythrin and
10 Texas Red are available. The fluorescent labels can be conjugated to the antibody using the techniques disclosed in Current Protocols in Immunology, supra, for example. Fluorescence can be quantified using a fluorimeter.

(c) Various enzyme-substrate labels are available and U.S. Pat. No. 4,275,149 provides a review of some of these. The enzyme generally catalyzes a chemical alteration of
15 the chromogenic substrate which can be measured using various techniques. For example, the enzyme may catalyze a color change in a substrate, which can be measured spectrophotometrically. Alternatively, the enzyme may alter the fluorescence or chemiluminescence of the substrate. Techniques for quantifying a change in fluorescence are described above. The chemiluminescent substrate becomes electronically excited by a
20 chemical reaction and may then emit light which can be measured (using a chemiluminometer, for example) or donates energy to a fluorescent acceptor. Examples of enzymatic labels include luciferases (e.g., firefly luciferase and bacterial luciferase; U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, malate dehydrogenase, urease, peroxidase such as horseradish peroxidase (HRPO), alkaline phosphatase, .beta.-
25 galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases (e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), heterocyclic oxidases (such as uricase and xanthine oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase, and the like. Techniques for conjugating enzymes to antibodies are described in O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in
30 Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981). Examples of enzyme-substrate combinations include, for example:

(i) Horseradish peroxidase (HRPO) with hydrogen peroxidase as a substrate, wherein the hydrogen peroxidase oxidizes a dye precursor (e.g., orthophenylene diamine (OPD) or 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine hydrochloride (TMB));

5 (ii) alkaline phosphatase (AP) with para-Nitrophenyl phosphate as chromogenic substrate; and

(iii) β -D-galactosidase (β -D-Gal) with a chromogenic substrate (e.g., P-nitrophenyl- β -D-galactosidase) or fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-.beta.-D-galactosidase.

Numerous other enzyme-substrate combinations are available to those skilled in the art. For a general review of these, see U.S. Pat. Nos. 4,275,149 and 4,318,980. Sometimes, the label is indirectly conjugated with the antibody. The skilled artisan will be aware of various techniques for achieving this. For example, the antibody can be conjugated with biotin and any of the three broad categories of labels mentioned above can be conjugated with avidin, or vice versa. Biotin binds selectively to avidin and thus, the label can be conjugated with the antibody in this indirect manner. Alternatively, to achieve indirect
15 conjugation of the label with the antibody, the antibody is conjugated with a small hapten (e.g., digoxin) and one of the different types of labels mentioned above is conjugated with an anti-hapten antibody (e.g., anti-digoxin antibody). Thus, indirect conjugation of the label with the antibody can be achieved.

In certain embodiments, an antibody need not be labeled, and the presence thereof can
20 be detected using a labeled antibody which binds to a target antibody.

The antibodies of the present invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

25 Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard to compete with the test sample analyte for binding with a limited amount of antibody. For example, the amount of TNF protein in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies generally are insolubilized before or after the competition, so
30 that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected. In a sandwich assay, the test sample analyte is bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. See, e.g., U.S. Pat. No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assay). For example, one type of sandwich assay is an ELISA assay, in which case the detectable moiety is an enzyme.

For immunohistochemistry, the tissue sample, such as a tumor sample, may be fresh or frozen or may be embedded in paraffin and fixed with a preservative such as formalin, for example.

The antibodies may also be used for in vivo tumor diagnostic assays. Generally, the antibody is labeled with a radio nuclide (such as ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P or ^{35}S) so that the tumor can be localized using immunoscintigraphy.

An antibody of the present invention can be provided in a kit, a packaged combination of reagents in predetermined amounts with instructions for performing the diagnostic assay. Where the antibody is labeled with an enzyme, the kit will include substrates and cofactors required by the enzyme (e.g., a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). In addition, other additives may be included such as stabilizers, buffers (e.g., a block buffer or lysis buffer) and the like. The relative amounts of the various reagents may be varied widely to provide for concentrations in solution of the reagents which substantially optimize the sensitivity of the assay. Particularly, the reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients which on dissolution will provide a reagent solution having the appropriate concentration.

The invention further provides pharmaceutical formulations comprising one or more antibodies of the invention for therapeutic purposes. In one embodiment, the invention provides anti-TNF antibodies for the treatment of TNF-mediated diseases.

The term "pharmaceutical formulation" refers to preparations which are in such form as to permit the biological activity of the antibody to be unequivocally effective, and which contain no additional components which are toxic to the subjects to which the formulation would be administered. "Pharmaceutically acceptable" excipients (vehicles, additives) are

those which can reasonably be administered to a subject mammal to provide an effective dose of the active ingredient employed.

A "stable" formulation is one in which the antibody therein essentially retains its physical stability and/or chemical stability and/or biological activity upon storage. Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are reviewed
5 in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), for example. Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period. Preferably, the formulation is stable at room temperature (about 30° C) or at 40° C for at least
10 1 month and/or stable at about 2-8° C for at least 1 year for at least 2 years. Furthermore, the formulation is preferably stable following freezing (to, e.g., -70° C) and thawing of the formulation.

An antibody "retains its physical stability" in a pharmaceutical formulation if it shows no signs of aggregation, precipitation and/or denaturation upon visual examination of color
15 and/or clarity, or as measured by UV light scattering or by size exclusion chromatography.

An antibody "retains its chemical stability" in a pharmaceutical formulation, if the chemical stability at a given time is such that the protein is considered to still retain its biological activity as defined below. Chemical stability can be assessed by detecting and quantifying chemically altered forms of the protein. Chemical alteration may involve size
20 modification (e.g. clipping) which can be evaluated using size exclusion chromatography, SDS-PAGE and/or matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF MS), for example. Other types of chemical alteration include charge alteration (e.g. occurring as a result of deamidation) which can be evaluated by ion-exchange chromatography, for example.

25 An antibody "retains its biological activity" in a pharmaceutical formulation, if the biological activity of the antibody at a given time is within about 10% (within the errors of the assay) of the biological activity exhibited at the time the pharmaceutical formulation was prepared as determined in an antigen binding assay, for example. Other "biological activity" assays for antibodies are elaborated herein below.

30 By "isotonic" is meant that the formulation of interest has essentially the same osmotic pressure as human blood. Isotonic formulations will generally have an osmotic

pressure from about 250 to 350 mOsm. Isotonicity can be measured using a vapor pressure or ice-freezing type osmometer, for example.

A "polyol" is a substance with multiple hydroxyl groups, and includes sugars (reducing and non-reducing sugars), sugar alcohols and sugar acids. Preferred polyols herein
5 have a molecular weight which is less than about 600 kD (e.g. in the range from about 120 to about 400 kD). A "reducing sugar" is one which contains a hemiacetal group that can reduce metal ions or react covalently with lysine and other amino groups in proteins and a "non-reducing sugar" is one which does not have these properties of a reducing sugar. Examples of
10 reducing sugars are fructose, mannose, maltose, lactose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, galactose and glucose. Non-reducing sugars include sucrose, trehalose, sorbose, melezitose and raffinose. Mannitol, xylitol, erythritol, threitol, sorbitol and glycerol are examples of sugar alcohols. As to sugar acids, these include L-gluconate and metallic salts thereof. Where
15 it is desired that the formulation is freeze-thaw stable, the polyol is preferably one which does not crystallize at freezing temperatures (e.g. -20°C) such that it destabilizes the antibody in the formulation. Non-reducing sugars include, but are not limited to, sucrose and trehalose.

As used herein, "buffer" refers to a buffered solution that resists changes in pH by the action of its acid-base conjugate components. The buffer of this invention has a pH in the range from about 4.5 to about 7.0; preferably from about 4.8 to about 6.5. Examples of
20 buffers that will control the pH in this range include acetate (e.g. sodium acetate), succinate (such as sodium succinate), gluconate, histidine, citrate and other organic acid buffers. Where a freeze-thaw stable formulation is desired, the buffer is preferably not phosphate.

In a pharmacological sense, in the context of the present invention, a "therapeutically effective amount" of an antibody refers to an amount effective in the prevention or treatment of a disorder for the treatment of which the antibody is effective. A "disease/disorder" is any
25 condition that would benefit from treatment with the antibody. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question.

A "preservative" is a compound which can be included in the formulation to essentially reduce bacterial action therein, thus facilitating the production of a multi-use
30 formulation, for example. Examples of potential preservatives include octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride (a mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in which the alkyl groups are

long-chain compounds), and benzethonium chloride. Other types of preservatives include aromatic alcohols such as phenol, butyl and benzyl alcohol, alkyl parabens such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and m-cresol. The most preferred preservative herein is benzyl alcohol.

5 The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising one or more antibodies, together with at least one physiologically acceptable carrier or excipient. Pharmaceutical compositions may comprise, for example, one or more of water, buffers (*e.g.*, neutral buffered saline or phosphate buffered saline), ethanol, mineral oil, vegetable oil, dimethylsulfoxide, carbohydrates (*e.g.*, glucose, mannose, sucrose or dextrans), mannitol,
10 proteins, adjuvants, polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, chelating agents such as EDTA or glutathione and/or preservatives. As noted above, other active ingredients may (but need not) be included in the pharmaceutical compositions provided herein.

 A carrier is a substance that may be associated with an antibody prior to
15 administration to a patient, often for the purpose of controlling stability or bioavailability of the compound. Carriers for use within such formulations are generally biocompatible, and may also be biodegradable. Carriers include, for example, monovalent or multivalent molecules such as serum albumin (*e.g.*, human or bovine), egg albumin, peptides, polylysine and polysaccharides such as aminodextran and polyamidoamines. Carriers also include solid
20 support materials such as beads and microparticles comprising, for example, polylactate polyglycolate, poly(lactide-co-glycolide), polyacrylate, latex, starch, cellulose or dextran. A carrier may bear the compounds in a variety of ways, including covalent bonding (either directly or via a linker group), noncovalent interaction or admixture.

 Pharmaceutical compositions may be formulated for any appropriate manner of
25 administration, including, for example, ocular, intranasal, otic, sublingual, transdermal, topical, oral, nasal, rectal or parenteral administration. In certain embodiments, compositions in a form suitable for oral use are preferred. Such forms include, for example, pills, tablets, troches, lozenges, aqueous or oily suspensions, dispersible powders or granules, emulsion, hard or soft capsules, or syrups or elixirs. Within yet other embodiments, compositions
30 provided herein may be formulated as a lyophilizate. The term parenteral as used herein includes subcutaneous, intradermal, intravascular (*e.g.*, intravenous), intramuscular, spinal, intracranial, intrathecal and intraperitoneal injection, as well as any similar injection or infusion technique.

In certain embodiments, an antibody of the invention can be delivered directly to the eye by ocular tissue injection such as periocular, conjunctival, subtenon, intracameral, intravitreal, intraocular, subretinal, subconjunctival, retrobulbar, or intracanalicular injections; by direct application to the eye using a catheter or other placement device such as
5 a retinal pellet, intraocular insert, suppository or an implant comprising a porous, non-porous, or gelatinous material; by topical ocular drops or ointments; or by a slow release device in the cul-de-sac or implanted adjacent to the sclera (transscleral) or in the sclera (intrasccleral) or within the eye. Intracameral injection may be through the cornea into the anterior chamber to allow the agent to reach the trabecular meshwork. Intracanalicular injection may be into the
10 venous collector channels draining Schlemm's canal or into Schlemm's canal.

For ophthalmic delivery, an antibody of the invention may be combined with ophthalmologically acceptable preservatives, co-solvents, surfactants, viscosity enhancers, penetration enhancers, buffers, sodium chloride, or water to form an aqueous, sterile ophthalmic suspension or solution. Topical ophthalmic products may be packaged, for
15 example, in multidose form. Preservatives may thus be required to prevent microbial contamination during use. Suitable preservatives include: chlorobutanol, methyl paraben, propyl paraben, phenylethyl alcohol, edetate disodium, sorbic acid, polyquaternium-1, or other agents known to those skilled in the art. Such preservatives are typically employed at a level of from 0.001 to 1.0% w/v. Unit dose compositions of the present invention will be
20 sterile, but typically unpreserved. Such compositions, therefore, generally will not contain preservatives.

In certain embodiments, compositions intended to be administered topically to the eye are formulated as eye drops or eye ointments, wherein the total amount of antibody will be about 0.001 to 1.0% (w/w). Preferably, the amount of TNF α antibody is about 0.01 to about
25 1.0% (w/w).

Compositions of the invention in certain circumstances will be administered as solutions for topical administration. Aqueous solutions are generally preferred, based on ease of formulation, as well as a patient's ability to easily administer such compositions by means of instilling one to two drops of the solutions in the affected eyes. However, the
30 compositions may also be suspensions, viscous or semi-viscous gels, or other types of solid or semi-solid compositions.

Compositions intended for oral use may be prepared according to any method known to the art for the manufacture of pharmaceutical compositions and may contain one or more agents, such as sweetening agents, flavoring agents, coloring agent, and preserving agents in order to provide appealing and palatable preparations. Tablets contain the active ingredient in admixture with physiologically acceptable excipients that are suitable for the manufacture of tablets. Such excipients include, for example, inert diluents (*e.g.*, calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, calcium phosphate or sodium phosphate), granulating and disintegrating agents (*e.g.*, corn starch or alginic acid), binding agents (*e.g.*, starch, gelatin or acacia) and lubricating agents (*e.g.*, magnesium stearate, stearic acid or talc). The tablets may be uncoated or they may be coated by known techniques to delay disintegration and absorption in the gastrointestinal tract and thereby provide a sustained action over a longer period. For example, a time delay material such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate may be employed.

Formulations for oral use may also be presented as hard gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with an inert solid diluent (*e.g.*, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin), or as soft gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with water or an oil medium (*e.g.*, peanut oil, liquid paraffin or olive oil). Aqueous suspensions contain the antibody in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients include suspending agents (*e.g.*, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydropropylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia); and dispersing or wetting agents (*e.g.*, naturally-occurring phosphatides such as lecithin, condensation products of an alkylene oxide with fatty acids such as polyoxyethylene stearate, condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols such as heptadecaethyleneoxycetanol, condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides such as polyethylene sorbitan monooleate). Aqueous suspensions may also comprise one or more preservatives, for example ethyl or n-propyl p-hydroxybenzoate, one or more coloring agents, one or more flavoring agents, and one or more sweetening agents, such as sucrose or saccharin. Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents, such as glycerol, propylene glycol, sorbitol, or sucrose. Such formulations may also comprise one or more demulcents, preservatives, flavoring agents, and/or coloring agents.

Oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredients in a vegetable oil (*e.g.*, arachis oil, olive oil, sesame oil, or coconut oil) or in a mineral oil such as liquid paraffin. The oily suspensions may contain a thickening agent such as beeswax, hard paraffin, or cetyl alcohol. Sweetening agents, such as those set forth above, and/or flavoring agents may be added to provide palatable oral preparations. Such suspensions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid.

Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water provide the active ingredient in admixture with a dispersing or wetting agent, suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting agents and suspending agents are exemplified by those already mentioned above. Additional excipients, for example sweetening, flavoring and coloring agents, may also be present.

Pharmaceutical compositions may also be in the form of oil-in-water emulsions. The oily phase may be a vegetable oil (*e.g.*, olive oil or arachis oil), a mineral oil (*e.g.*, liquid paraffin), or a mixture thereof. Suitable emulsifying agents include naturally-occurring gums (*e.g.*, gum acacia or gum tragacanth), naturally-occurring phosphatides (*e.g.*, soy bean, lecithin, and esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol), anhydrides (*e.g.*, sorbitan monoleate), and condensation products of partial esters derived from fatty acids and hexitol with ethylene oxide (*e.g.*, polyoxyethylene sorbitan monoleate). An emulsion may also comprise one or more sweetening and/or flavoring agents.

The pharmaceutical composition may be prepared as a sterile injectible aqueous or oleaginous suspension in which the modulator, depending on the vehicle and concentration used, is either suspended or dissolved in the vehicle. Such a composition may be formulated according to the known art using suitable dispersing, wetting agents and/or suspending agents such as those mentioned above. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, 1,3-butanediol, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils may be employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed, including synthetic mono- or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid may be used in the preparation of injectible compositions, and adjuvants such as local anesthetics, preservatives and/or buffering agents can be dissolved in the vehicle.

Pharmaceutical compositions may be formulated as sustained release formulations (*i.e.*, a formulation such as a capsule that affects a slow release of modulator following administration). Such formulations may generally be prepared using well known technology and administered by, for example, oral, rectal, or subcutaneous implantation, or by
5 implantation at the desired target site. Carriers for use within such formulations are biocompatible, and may also be biodegradable; preferably the formulation provides a relatively constant level of modulator release. The amount of an antibody contained within a sustained release formulation depends upon, for example, the site of implantation, the rate and expected duration of release and the nature of the disease/disorder to be treated or
10 prevented.

Anti-TNF α antibodies provided herein can be administered in an amount that achieves a concentration in a body fluid (*e.g.*, blood, plasma, serum, CSF, synovial fluid, lymph, cellular interstitial fluid, tears or urine) that is sufficient to detectably bind to TNF and prevent or inhibit TNF-mediated diseases/disorders. A dose is considered to be effective if it
15 results in a discernible patient benefit as described herein. Preferred systemic doses range from about 0.1 mg to about 140 mg per kilogram of body weight per day (about 0.5 mg to about 7 g per patient per day), with oral doses generally being about 5-20 fold higher than intravenous doses. The amount of antibody that may be combined with the carrier materials to produce a single dosage form will vary depending upon the host treated and the particular
20 mode of administration. Dosage unit forms will generally contain between from about 1 mg to about 500 mg of an active ingredient.

In certain embodiments, pharmaceutical compositions may be packaged for treating conditions responsive to an antibody directed to TNF. Packaged pharmaceutical compositions may include a container holding an effective amount of at least one antibody as
25 described herein and instructions (*e.g.*, labeling) indicating that the contained composition is to be used for treating a disease/disorder responsive to one antibody following administration in the patient.

The antibodies of the present invention can also be chemically modified. Preferred modifying groups are polymers, for example an optionally substituted straight or branched chain polyalkene, polyalkenylene, or polyoxyalkylene polymer or a branched or unbranched
30 polysaccharide. Such effector group may increase the half-life of the antibody *in vivo*. Particular examples of synthetic polymers include optionally substituted straight or branched chain poly(ethyleneglycol) (PEG), poly(propyleneglycol), poly(vinylalcohol) or derivatives

thereof. Particular naturally occurring polymers include lactose, amylose, dextran, glycogen or derivatives thereof. The size of the polymer may be varied as desired, but will generally be in an average molecular weight range from 500Da to 50000Da. For local application where the antibody is designed to penetrate tissue, a preferred molecular weight of the polymer is around 5000Da. The polymer molecule can be attached to the antibody, for example to the C-terminal end of a Fab fragment heavy chain via a covalently linked hinge peptide as described in WO0194585. Regarding the attachment of PEG moieties, reference is made to "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

After preparation of the antibody of interest as described above, the pharmaceutical formulation comprising it is prepared. The antibody to be formulated has not been subjected to prior lyophilization and the formulation of interest herein is an aqueous formulation. Preferably the antibody in the formulation is an antibody fragment, such as an scFv. The therapeutically effective amount of antibody present in the formulation is determined by taking into account the desired dose volumes and mode(s) of administration, for example. From about 0.1 mg/ml to about 50 mg/ml, preferably from about 0.5 mg/ml to about 25 mg/ml and most preferably from about 2 mg/ml to about 10 mg/ml is an exemplary antibody concentration in the formulation.

An aqueous formulation is prepared comprising the antibody in a pH-buffered solution as described above. The buffer concentration can be from about 1 mM to about 50 mM, preferably from about 5 mM to about 30 mM, depending, for example, on the buffer and the desired isotonicity of the formulation.

A polyol, which acts as a tonicifier and may stabilize the antibody, is included in the formulation. In preferred embodiments, the formulation does not contain a tonicifying amount of a salt such as sodium chloride, as this may cause the antibody to precipitate and/or may result in oxidation at low pH. In preferred embodiments, the polyol is a non-reducing sugar, such as sucrose or trehalose. The polyol is added to the formulation in an amount which may vary with respect to the desired isotonicity of the formulation. Preferably the aqueous formulation is isotonic, in which case suitable concentrations of the polyol in the formulation are in the range from about 1% to about 15% w/v, preferably in the range from about 2% to about 10% w/v, for example. However, hypertonic or hypotonic formulations

may also be suitable. The amount of polyol added may also alter with respect to the molecular weight of the polyol. For example, a lower amount of a monosaccharide (e.g. mannitol) may be added, compared to a disaccharide (such as trehalose).

A surfactant may also be added to the antibody formulation. Exemplary surfactants
5 include nonionic surfactants such as polysorbates (e.g. polysorbates 20, 80 etc) or poloxamers (e.g. poloxamer 188). Typically, the amount of surfactant added is such that it reduces aggregation of the formulated antibody/antibody derivative and/or minimizes the formation of particulates in the formulation and/or reduces adsorption. For example, the surfactant may be present in the formulation in an amount from about 0.001% to about 0.5%, preferably
10 from about 0.005% to about 0.2% and most preferably from about 0.01% to about 0.1%.

In one embodiment, a formulation contains the above-identified agents (i.e. antibody, buffer, polyol and surfactant) and is essentially free of one or more preservatives, such as benzyl alcohol, phenol, m-cresol, chlorobutanol and benzethonium Cl. In another
15 embodiment, a preservative may be included in the formulation, particularly where the formulation is a multidose formulation. The concentration of preservative may be in the range from about 0.1% to about 2%, most preferably from about 0.5% to about 1%. One or more other pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers such as those described in Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, Osol, A. Ed. (2006) may be included in
20 the formulation provided that they do not adversely affect the desired characteristics of the formulation. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed and include; additional buffering agents; co-solvents; antioxidants including ascorbic acid and methionine; chelating agents such as EDTA; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); biodegradable polymers such as polyesters; and/or salt-forming counterions such as sodium.

25 The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to, or following, preparation of the formulation.

The formulation is administered to a mammal in need of treatment with the antibody, preferably a human, in accord with known methods, such as intravenous administration as a
30 bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes, or other routes as described herein. In certain embodiments, the formulation

is administered to the mammal by intravenous administration. For such purposes, the formulation may be injected using a syringe or via an IV line, for example.

The appropriate dosage ("therapeutically effective amount") of the antibody will depend, for example, on the condition to be treated, the severity and course of the condition, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, the type of antibody used, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments and may be administered to the patient at any time from diagnosis onwards. The antibody may be administered as the sole treatment or in conjunction with other drugs or therapies useful in treating the condition in question.

As a general proposition, the therapeutically effective amount of the antibody administered will be in the range of about 0.1 to about 100 mg/kg of patient body weight whether by one or more administrations, with the typical range of antibody used being about 0.3 to about 20 mg/kg, more preferably about 0.3 to about 15 mg/kg, administered daily, for example. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques.

In certain embodiments, pharmaceutical compositions comprising an anti-TNF α antibody of the invention are administered to a patient suffering from a TNF-mediated disorder.

In another embodiment of the invention, an article of manufacture is provided comprising a container which holds the aqueous pharmaceutical formulation of the present invention and optionally provides instructions for its use. Suitable containers include, for example, bottles, vials and syringes. The container may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. An exemplary container is a 3-20 cc single use glass vial. Alternatively, for a multidose formulation, the container may be 3-100 cc glass vial. The container holds the formulation and the label on, or associated with, the container may indicate directions for use. The article of manufacture may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

The contents of any patents, patent applications, and references cited throughout this specification are hereby incorporated by reference in their entireties.

Unless otherwise required by context, singular terms used herein shall include pluralities and plural terms shall include the singular.

EXAMPLES

5 The present disclosure is further illustrated by the following examples, which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference in their entireties.

10 Throughout the examples, the following materials and methods were used unless otherwise stated.

General Materials and Methods

15 In general, the practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, recombinant DNA technology, immunology (especially, *e.g.*, antibody technology), and standard techniques of polypeptide preparation. See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory 20 Manual, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); and Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

Thermostability measurements

25 Attenuated total reflectance Fourier transform IR (FTIR-ATR) spectra were obtained for various single chains and follow up molecules using the FT-IR Bio-ATR cell in a Tensor Bruker. The molecules were concentrated up to 3mg/ml and dialyzed overnight at 4°C against PBS, pH 6.5 and the buffer flow through was collected as blank. The denaturation profiles were obtained by thermo challenging the molecules with a broad range of temperatures in 5°C steps (25 to 95°C). All spectra manipulations were performed using OPUS software. The 30 main buffer and transient atmospheric (CO₂ and H₂O) background were subtracted from the protein spectrum. The resulting protein spectrum was then baseline corrected and the protein

amide I spectra was determined from the width of the widest resolvable peak in the expected region. Second derivative spectra were obtained for the amide I band spectra using a third degree polynomial function with a smoothing function. Changes in protein structure were estimated by amide I second derivative analysis using a linear calibration curve for the initial
5 curve-fit calculations assuming 0% denaturation for the 3 lower measurements and 100% denaturation for the 3 higher measurements. The denaturation profiles were used to approximate midpoints of the thermal unfolding transitions (TM) for every variant applying the Boltzmann sigmoidal model.

10 Solubility measurements

Relative solubility of various scFv molecules was measured after enhancing protein aggregation and precipitation in presence of ammonium sulfate. Ammonium sulfate was added to the protein in aqueous solutions to yield increments of 5% of saturation in the final mixture salt-protein. The precipitation in the dynamic range was determined empirically and
15 the saturation intervals reduced in this range to 2.5% intervals saturation in the final mixture. After ammonium sulfate addition, samples were gently mixed and centrifuged 30 minutes at 6000rpm. The remaining protein in supernatants was recovered for each ammonium sulfate percentage of saturation. Solubility curves were determined by measuring the protein concentration in the supernatant using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.
20 Measurements of remaining soluble protein in supernatants were normalized and used to estimate midpoints of relative solubility for every variant applying the Boltzmann sigmoidal model.

Short Term Stability test

25 Protein was examined after two weeks incubation at 40°C for soluble aggregates and degradation products. Proteins with a concentration of 10mg/ml were dialyzed overnight at 4°C against PBS with a broad range of pHs (3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.5). Control protein with the same concentration in standard buffer PBS (pH 6.5) was stored at -80°C during the 2 weeks period. Determination of degradation bands by SDS-PAGE was done at
30 t=0 and t=14d time points and soluble aggregates were assessed in the SEC-HPLC. Determination of remaining activity after 2 weeks at 40°C was done using Biacore.

EXAMPLE 1

Optimization of anti-TNF α scFv antibody, 34rFW1.4, to Reduce Aggregation

The 34rFW1.4 antibody shows a propensity for pH dependent aggregation in solution.

5 The 578rFW1.4 antibody (see International Application WO2009155724), which shares the same framework structure as 34rFW1.4, does not show a propensity for aggregation. Homology models were generated to identify potential residues in the 34rFW1.4 that could be modified to reduce its aggregation propensity as follows.

Variable domain sequences were used to build homology models of the 34rFW1.4
10 antibody and the 578rFW1.4 antibody. To generate the models, BLAST algorithm-based searches were used to identify template structures for the light chain (VL) and heavy chain (VH) variable domain sequences for each antibody separately. BLOSUM80 (matrix for less divergent alignments) was used as the matrix for the alignments due to the high conservation of framework regions in antibodies. Individual templates for each chain (VL/VH) were
15 selected that showed more than 70% identity to the query sequences.

The program MODELER of the Discovery Studio version 2.5.5 (DS 2.5.5) software (Accelrys, Inc., San Diego, CA) was used to generate 100 scFv models based on the identified variable domain templates. Alignment of the reference antibody sequences to be modelled with template structures were used as input data. 100 models containing all non-
20 hydrogen atoms were generated. The best model structures were selected based on a PDF (Probability Density Function) physical energy score. Relative orientation of VH and VL domain was set to match the one from the variable domain template structure with the highest homology to both (VL and VH) sequences modelled. Alternate conformations in the model were removed, termini were added, and missing side-chain atoms were added. CHARMM
25 forcefield was applied to the scFv models and submitted to 2000 cycles of energy minimization using a RMS Gradient of 0.01 and the Generalized Born with Molecular Volume (GBMV) as implicit solvent model.

Protein Ionization and residue pK calculations for each of the antibodies were conducted. The calculations were done using the protocol implementation included in
30 Discovery Studio version 2.5.5 (DS 2.5.5), based on the theory developed by Bashford and Karplus, 1991. The results of protein ionization and residue pK calculations were compared for the two molecules in terms of pK_{1/2} of the side chains and titration curves of each

titratable residue, including Asp, Glu, Arg, Lys, His, Tyr, Cys, the N-terminal and C terminal residues of the antibodies.

CHARMM forcefield was applied to the scFv models and protonated at pH 7.4, titration curves and pKs of the individual residues were calculated from pH 2 to pH 14 range using pH steps of 0.2. Two conserved Lys residues at positions 47 and 50 in the light chain of the 578rFW1.4 antibody differed compared with the Lys at those positions in the 34rFW1.4 (see Figure 1).

Introduction of preferred substitutions

The Discovery Studio software was used to conduct molecular dynamics simulations to predict mutations that improve the interaction affinity between VL and VH, thereby preventing the domains from falling apart and forming oligomers and or higher order aggregates. The stability of the VL/VH interface of the 34rFW1.4 antibody was estimated as energy terms as free energy G. A CHARMM protocol adaptation (also included in DS 2.5.5) was used to calculate the energy difference between the entire scFv heterodimer complex and the sum of the energies of each of the individual variable domains. The calculations were done in the context of an implicit solvent method using the Generalized Born with Molecular Volume integration (GBMV). The energies of both domains and the complex were calculated, and the output was determined as the difference in energy between the complex and the sum of the individual domains according to the following calculation: $G_{\text{interface}} = G(a) - G(b) - G(c)$, where $G(a)$ is the energy of the antibody, $G(b)$ is the energy of the VL, and $G(c)$ is the energy of the VH.

Arginine (R) was selected as a possible residue substitution for the lysine (K) at positions 47 and 50, because the sidechain pKa value for R (12.5) is higher than pKa of K (10.5). Mutants K47R and K50R were generated by replacing K for R individually at the respective positions. 2000 cycles of energy minimization were performed for residues 10 Angstroms or closer to the area around the mutation to allow the new model molecules to adapt to the change. The implicit solvent model for these energy minimization rounds was GBMV. Predicted average delta G for the mutants was -94 kcal/mol. Therefore contribution of the mutations was estimated to be 4 kcal/mol compared to the parental anti-TNF scFv antibody.

Example 2

Stability Analysis of the Optimized 34rFW1.4 Antibody

K50R mutant and K47R mutant were generated in the 34rFW1.4 antibody (which is disclosed in co-pending International Application No. PCT/CH2009/000219, filed June 25, 2009, the contents of which are hereby incorporated by reference in its entirety). Another mutant of 34rFW1.4 having additional substitutions to reduce its immunogenicity *in vivo* was prepared according to the methods described in US Patent Application No. 12/973,968. In particular, the third mutant, designated 34rFW1.4_VLK50R_DHP, contained a serine (S) at heavy chain position 12 (AHo numbering), a threonine (T) at heavy chain position 103 (AHo numbering), and a threonine (T) at heavy chain position 144 (AHo numbering). Stability studies of the parent and mutant 34rFW1.4 antibodies were conducted under accelerated conditions as follows.

The 34rFW1.4 antibody, mutant 34rFW1.4_VL_K50R, and 34rFW1.4_VLK50R_DHP were concentrated up to 20, 40 and 60 mg/mL in phosphate buffered saline (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6.5) formulation and incubated 2 weeks at 40°C. The 34rFW1.4 and 34rFW1.4_K47R antibodies were concentrated up to 20 and 60 mg/mL in phosphate buffered saline (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6.5) formulation and incubated 2 weeks at 40°C. Samples were analyzed before and after 14 days incubation for degradation using 12.5 % sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions. Size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) was used to determine monomer content and soluble aggregates of the samples before and after the incubation period. Monomers were resolved from non-monomeric species on a TSKgel Super SW2000 column (TOSOH Bioscience) and the percentage of monomeric protein was calculated as the area of the monomer peak divided by the total area of all product peaks. The results of the studies for 34rFW1.4 and 34rFW1.4_VLK50R_DHP are shown in Figures 2A-B, 3A-B, and 4A-B, respectively. The results for 34rFW1.4_VL_K50R are shown in Figures 5B, 6B, and 7B. These experiments demonstrated that 34rFW1.4_VLK50R_DHP had a reduced propensity for aggregation compared with 34rFW1.4. The mutant 34rFW1.4_K47R also demonstrated such a reduction as shown in Figures 8B and 9B.

In addition, the thermal stability and binding affinities of 34rFW1.4 and 34rFW1.4_VLK50R_DHP antibodies were compared. The results demonstrated that the

mutations made to generate the 34rFW1.4_VLK50R_DHP antibody did not affect the stability or binding activity relative to the parent 34rFW1.4 antibody.

EQUIVALENTS

Numerous modifications and alternative embodiments of the present invention will be apparent to those skilled in the art in view of the foregoing description. Accordingly, this description is to be construed as illustrative only and is for the purpose of teaching those skilled in the art the best mode for carrying out the present invention. Details of the structure may vary substantially without departing from the spirit of the invention, and exclusive use of all modifications that come within the scope of the appended claims is reserved. It is intended that the present invention be limited only to the extent required by the appended claims and the applicable rules of law.

All literature and similar material cited in this application, including, patents, patent applications, articles, books, treatises, dissertations, web pages, figures and/or appendices, regardless of the format of such literature and similar materials, are expressly incorporated by reference in their entirety. In the event that one or more of the incorporated literature and similar materials differs from or contradicts this application, including defined terms, term usage, described techniques, or the like, this application controls.

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described in any way.

While the present inventions have been described in conjunction with various embodiments and examples, it is not intended that the present teachings be limited to such embodiments or examples. On the contrary, the present inventions encompass various alternatives, modifications, and equivalents, as will be appreciated by those of skill in the art.

The claims should not be read as limited to the described order or elements unless stated to that effect. It should be understood that various changes in form and detail may be made without departing from the scope of the appended claims. Therefore, all embodiments that come within the scope and spirit of the following claims and equivalents thereto are claimed.

What is claimed is:

1. An antibody that binds specifically to human TNF α , comprising:
 - a. a variable light chain comprising the sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 14; and
 - b. a variable heavy chain comprising the sequence of SEQ ID NO: 5.
2. The antibody of claim 1, wherein the variable light chain comprises the sequence of SEQ ID NO: 2.
3. The antibody of claim 1, wherein the variable light chain comprises the sequence of SEQ ID NO: 14.
4. The antibody of claim 1, further having a linker comprising the sequence of SEQ ID NO: 7.
5. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 10.
6. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 17.
7. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the antibody of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
8. A method of treating a TNF α -mediated disease comprising administering to a subject in need thereof the pharmaceutical composition of claim 7.
9. The method of claim 8, wherein the TNF α -mediated disease is an ocular disorder selected from the group consisting of uveitis, Bechet's disease, retinitis, dry eye, glaucoma, Sjörger syndrome, diabetic neuropathy, scleritis, age related macular degeneration and keratitis.

10. The method of claim 8, wherein the pharmaceutical composition is administered by ocular, intranasal, otic, sublingual, transdermal, topical, oral, nasal, rectal or parenteral administration.

11. The method of claim 10, wherein the pharmaceutical composition is administered in a single or divided dose comprising 0.1 to 100 mg of the antibody.

12. The method of claim 8, wherein the TNF α -mediated disease is uveitis, and the pharmaceutical composition is administered topically to an eye of the subject.

13. An isolated nucleic acid molecule encoding the antibody of claim 1.

14. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 13.

15. A host cell comprising the vector of claim 14.

16. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a Fab, Fab', a F(ab)'₂, single-chain Fv (scFv), an Fv fragment, or a linear antibody.

17. A bivalent or bispecific molecule comprising the antibody of claim 1.

18. A method for reducing an antibody's propensity for aggregation, the method comprising introducing one or more amino acid substitutions in the interface of a variable light chain (VL) and a variable heavy chain (VH) of the antibody, wherein the one or more substitutions are at residue positions selected to reduce the free energy between the VL and VH by at least 0.5 kcal/mol, thereby reducing the aggregation propensity of the antibody compared with a parental antibody.

19. The method of claim 18, wherein the antibody is a Fab, Fab', a F(ab)'₂, single-chain Fv (scFv), an Fv fragment, a diabody, a single-chain diabody, a tandem antibody or a linear antibody.

20. The method of claim 18, wherein the sequence of the variable light chain of the antibody has at least 65% identity to the sequence of SEQ ID NO: 1.

21. The method of claim 20, wherein the modification comprises a substitution at AHo position 50 and/or AHo position 47 of the variable light chain.

22. The method of claim 21, wherein the substitution is an arginine (R) at AHo position 50 and/or an arginine (R) at AHo position 47 of the variable light chain.

23. The method of claim 22, wherein lysine (K) is substituted by arginine (R) at AHo position 47 and/or 50 of the variable light chain.

24. The method of claim 18, wherein the antibody has a variable heavy chain sequence having at least 85% identity to the sequence of SEQ ID NO: 1.

25. The method of claim 18, wherein the antibody has a variable heavy chain sequence having at least 85% identity to the sequence of SEQ ID NO: 3 or the sequence of SEQ ID NO: 4.

26. The method of claim 18, further comprising amino acid substitutions at AHo positions 12, 103 and 144 of the variable heavy chain.

27. An antibody produced by the method of claim 18.

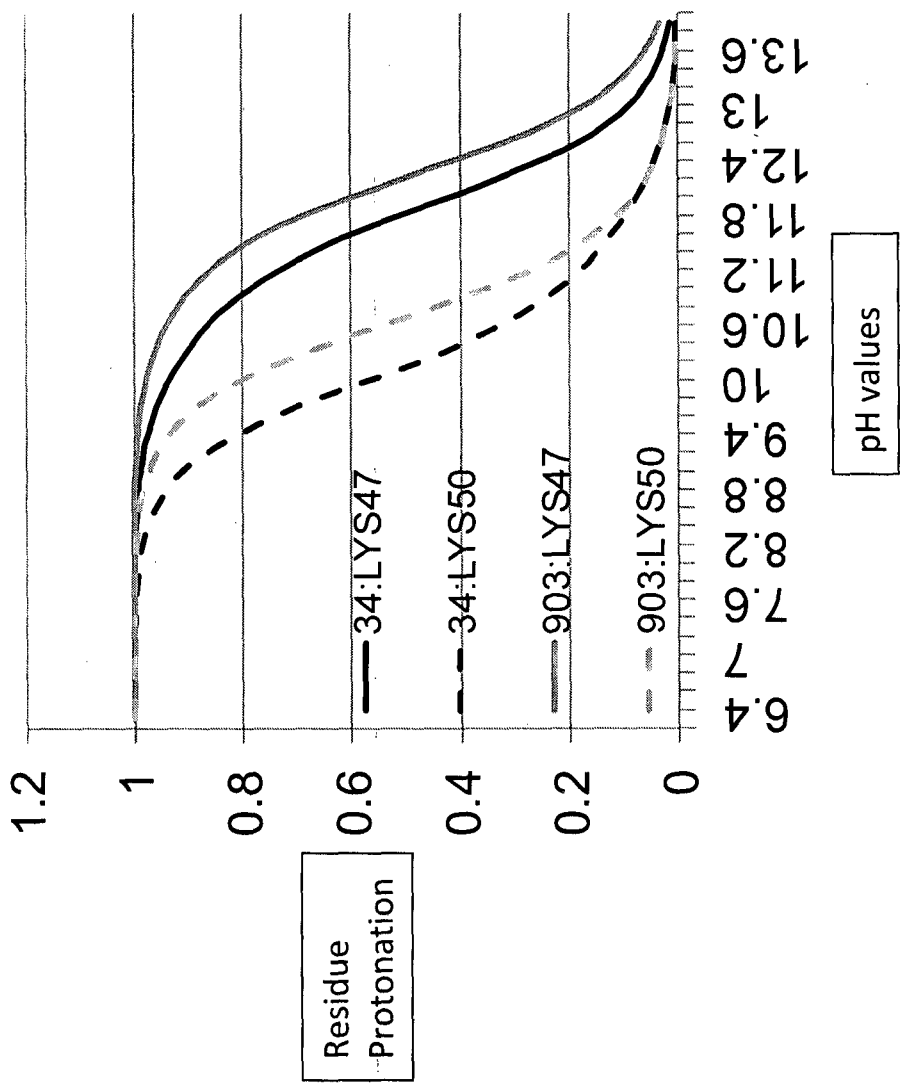


FIG. 1

34rFW1.4_VLK50R_DHP

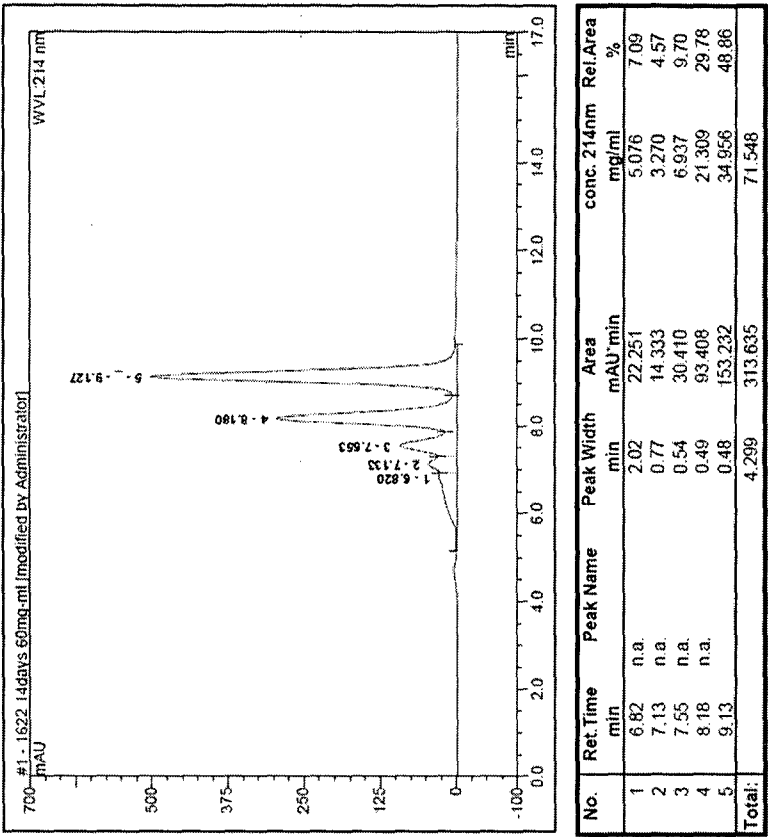


FIG. 2B

34rFW1.4

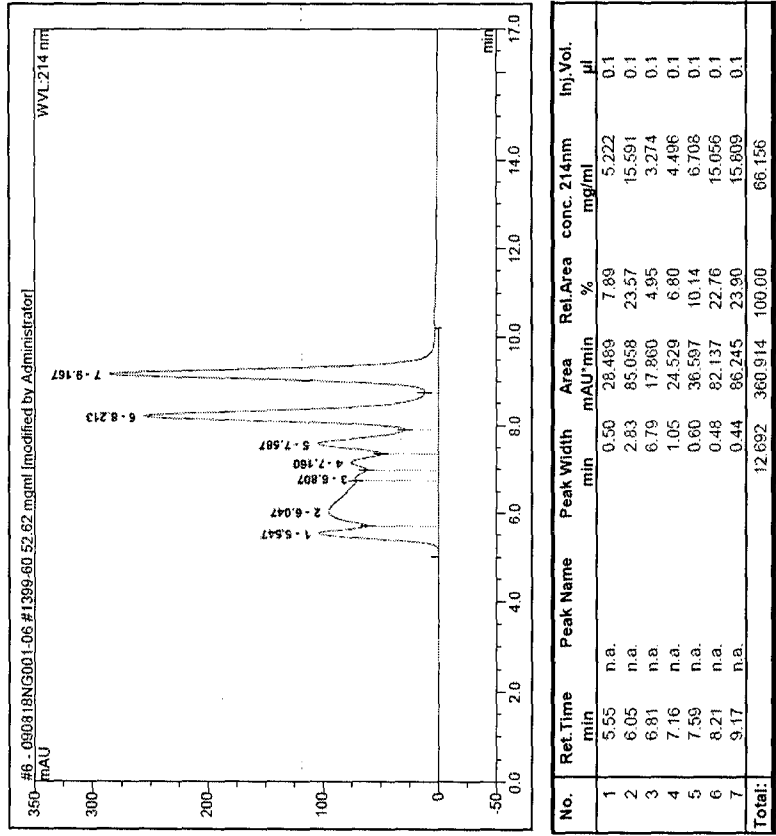


FIG. 2A

34rFW1.4_VLK50R_DHP

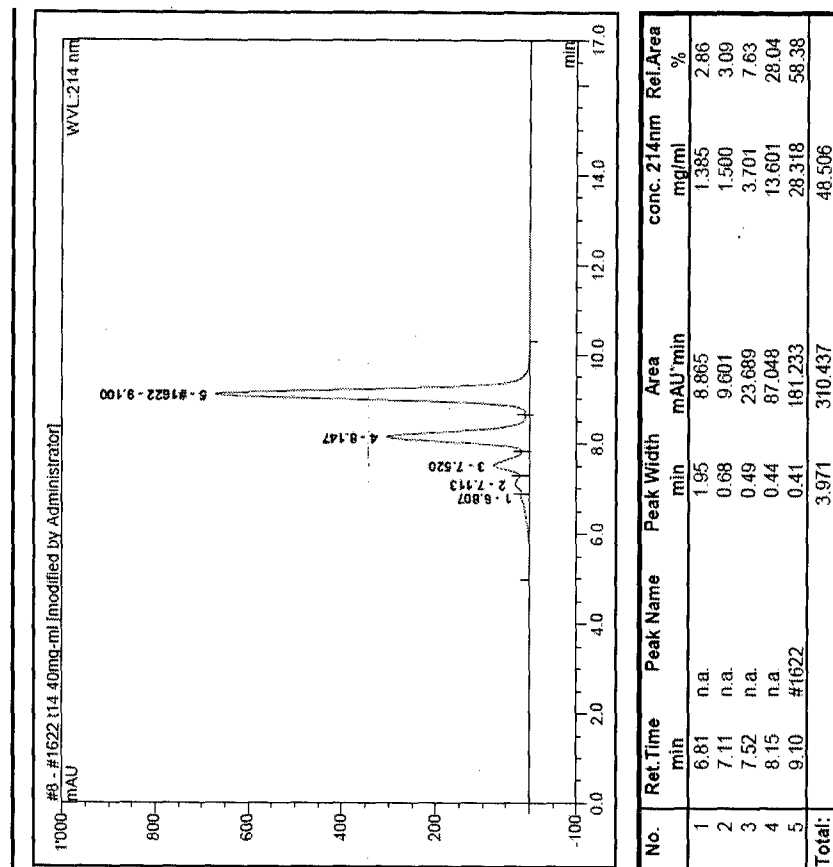


FIG. 3B

34rFW1.4

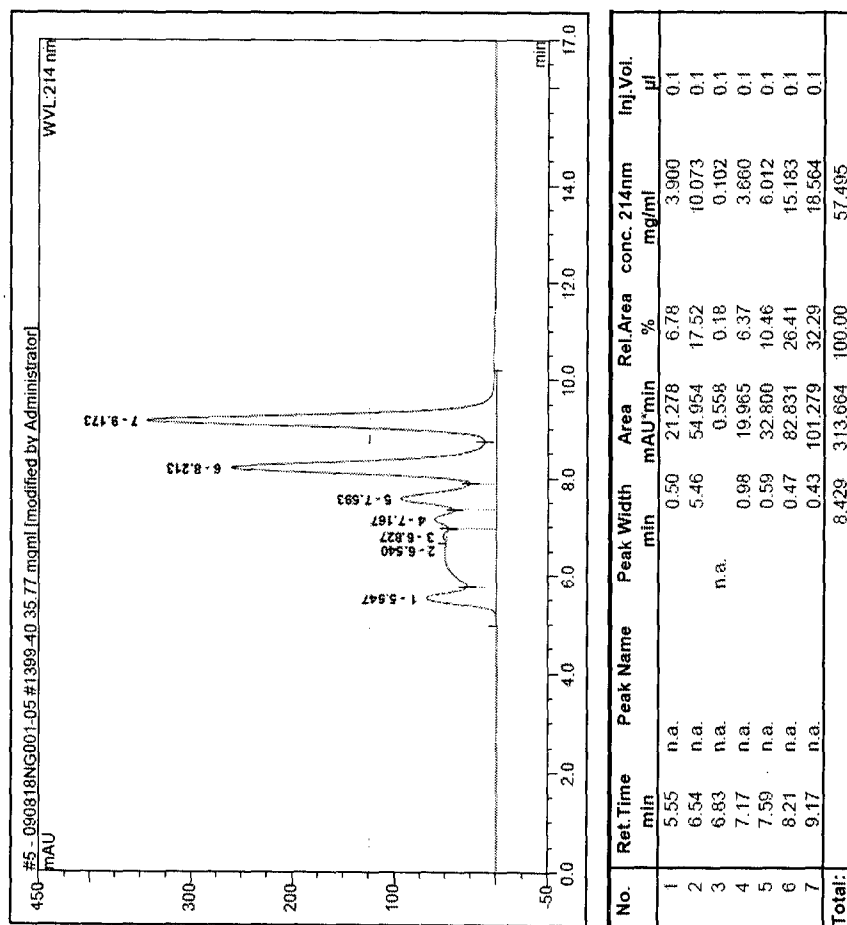
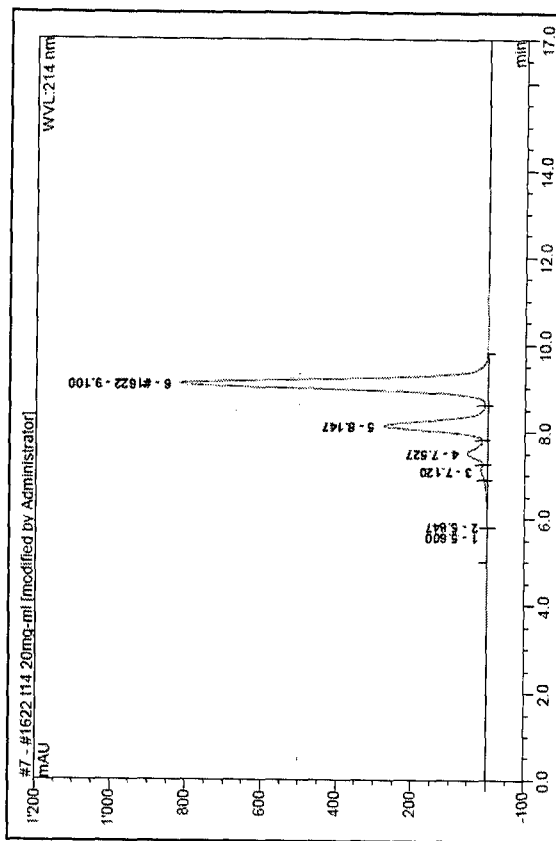


FIG. 3A

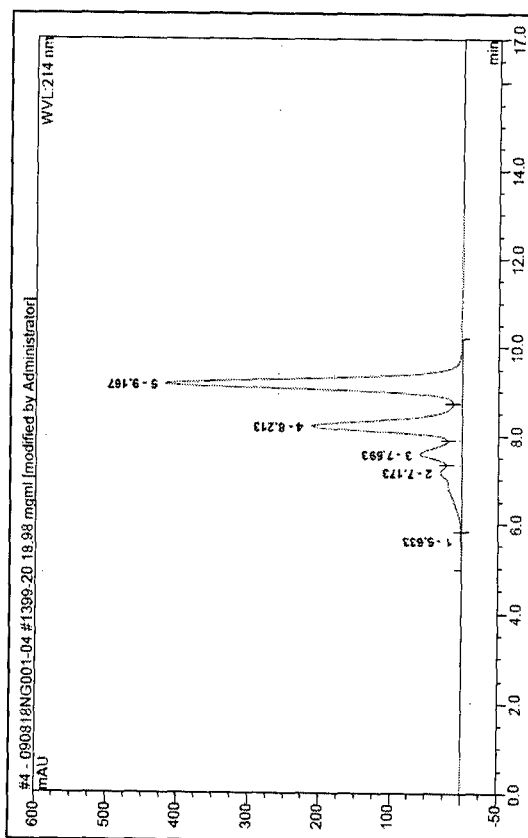
34rFW1.4_VLK50R_DHP



No.	Ret. Time min	Peak Name	Peak Width min	Area mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel. Area %
1	5.60	n.a.	0.61	0.280	0.024	0.09
2	5.85	n.a.	n.a.	3.142	0.274	0.96
3	7.12	n.a.	0.72	5.116	0.446	1.57
4	7.53	n.a.	0.50	17.058	1.488	5.24
5	8.15	n.a.	0.44	79.772	6.959	24.49
6	9.10	#1622	0.41	220.374	19.225	67.65
Total:			2.676	325.743	28.417	

FIG. 4B

34rFW1.4



No.	Ret. Time min	Peak Name	Peak Width min	Area mAU*min	Rel. Area %	conc. 214nm mg/ml	Inj. Vol. µl
1	5.63	n.a.	0.62	0.611	0.26	0.056	0.2
2	7.17	n.a.	0.95	21.021	9.02	1.927	0.2
3	7.59	n.a.	0.60	21.265	9.13	1.949	0.2
4	8.21	n.a.	0.47	67.889	29.14	6.222	0.2
5	9.17	n.a.	0.44	122.204	52.45	11.200	0.2
Total:			3.076	232.991	100.00	21.354	

FIG. 4A

34rFW1.4

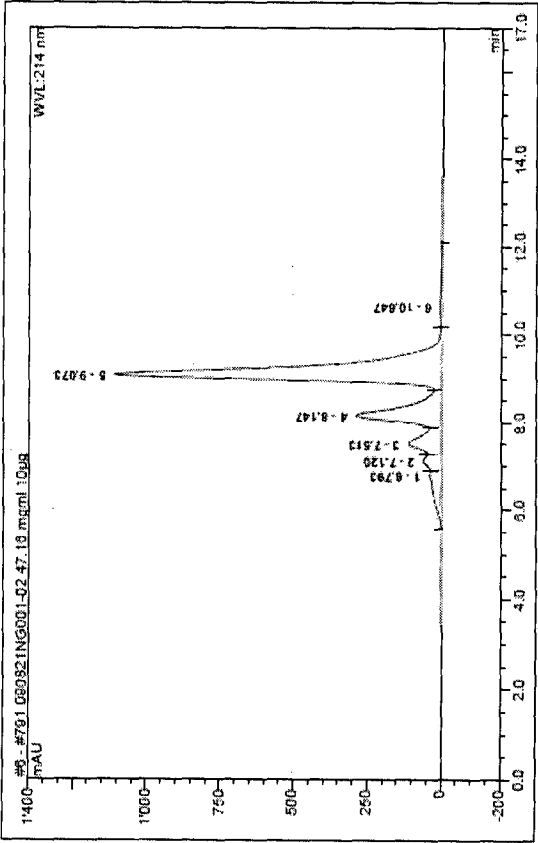


FIG. 6A

K50R

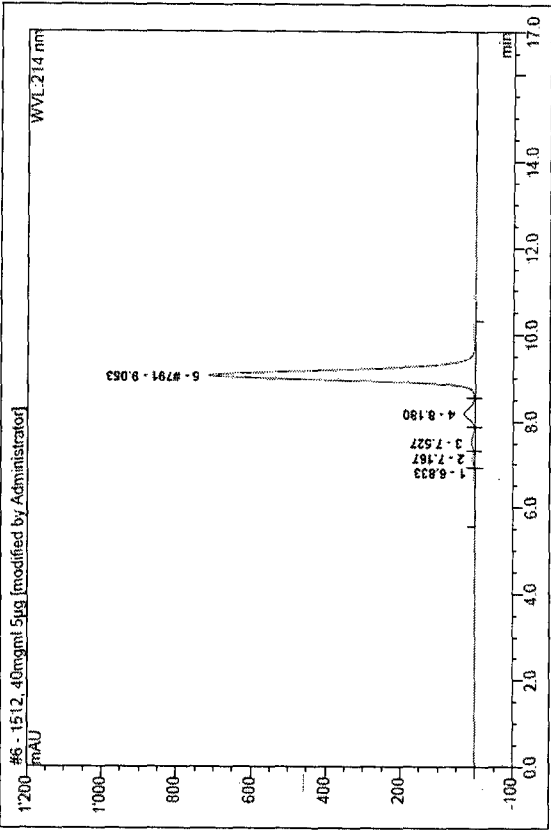
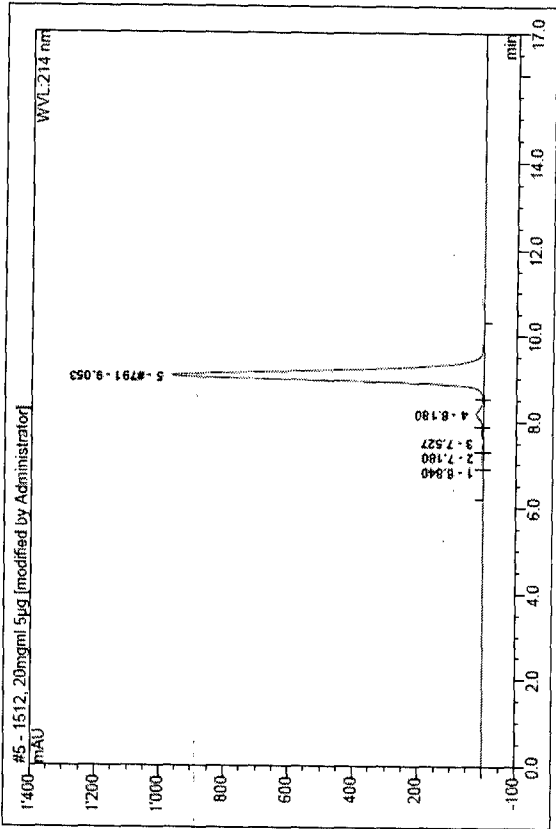


FIG. 6B

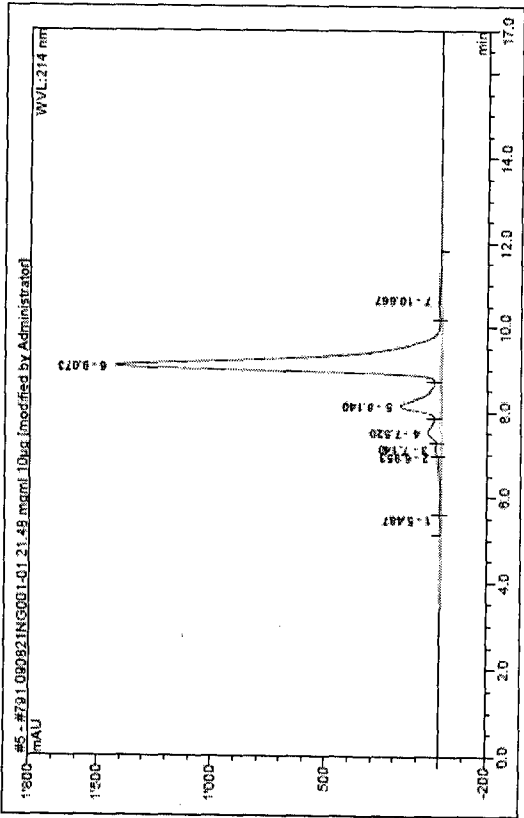
34rFW1.4_K50R



No.	Ret.Time min	Peak Name	Peak Width min	Area mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.Area %
1	8.180	n.a.	0.333	0.333	0.163	0.12
2	7.18	n.a.	0.79	0.949	0.206	0.34
3	7.53	n.a.	0.73	2.945	0.345	1.06
4	8.18	n.a.	0.50	7.617	0.670	2.75
5	9.05	#791	0.42	265.515	18.619	95.73
Total:			3.734	277.358	20.002	

FIG. 7B

34rFW1.4



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	conc. 214nm mg/ml	Inj.Vol. µl
1	5.49	n.a.	0.189	0.051	0.01	0.077	0.5
2	6.95	n.a.	12.384	5.352	0.88	0.275	0.5
3	7.14	n.a.	22.388	6.197	1.02	0.307	0.5
4	7.52	n.a.	55.426	22.675	3.72	0.924	0.5
5	8.14	n.a.	177.856	89.648	11.41	2.681	0.5
6	9.07	n.a.	1429.609	496.673	81.72	18.735	0.5
7	10.67	n.a.	7.947	7.625	1.25	0.360	0.5

FIG. 7A

34rFW1.4_K47R

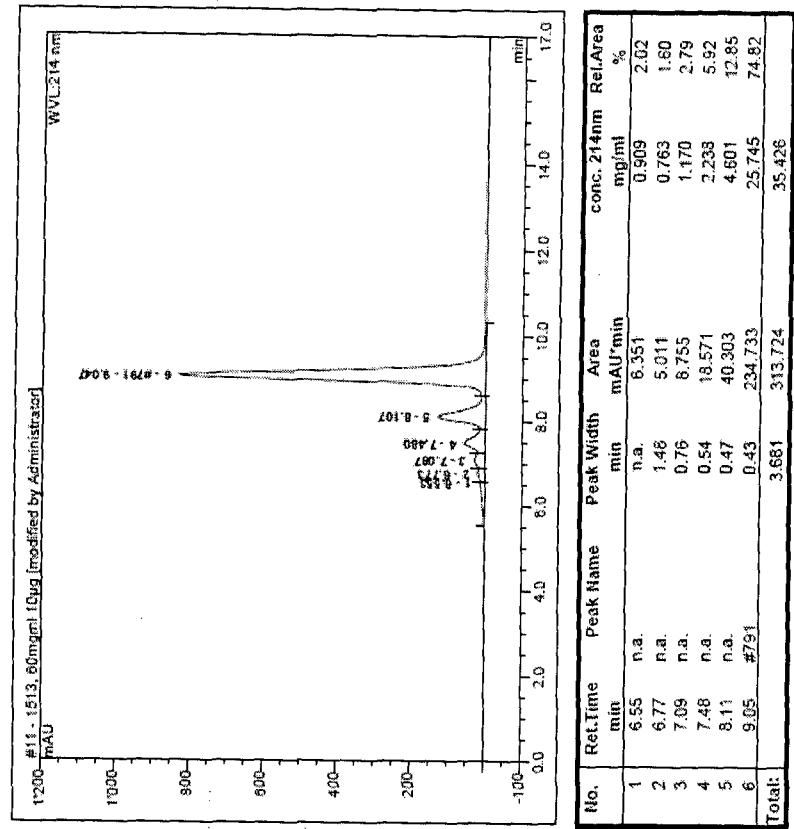


FIG. 8B

34rFW1.4

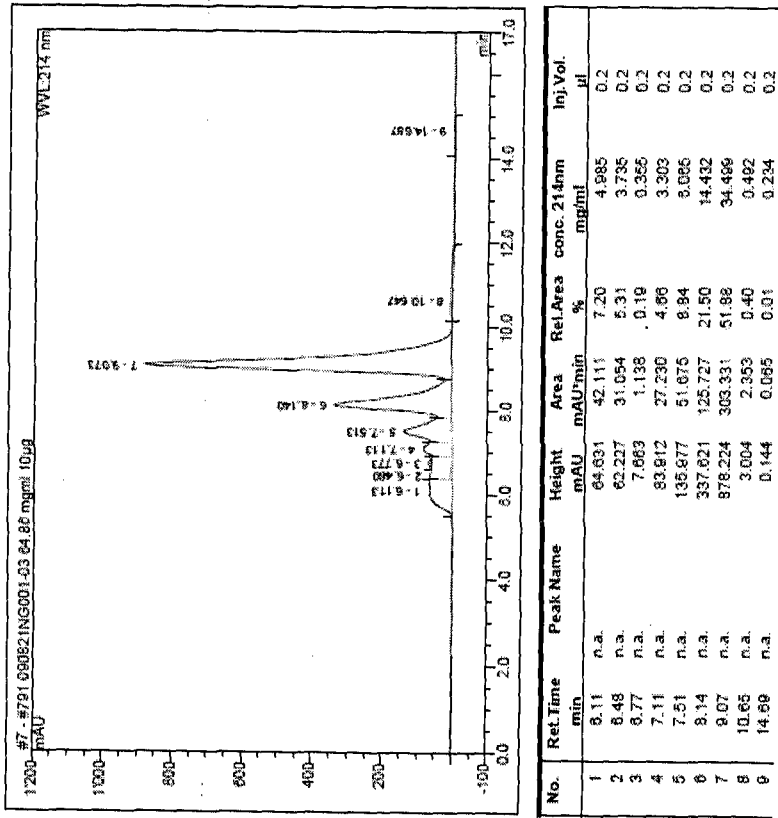
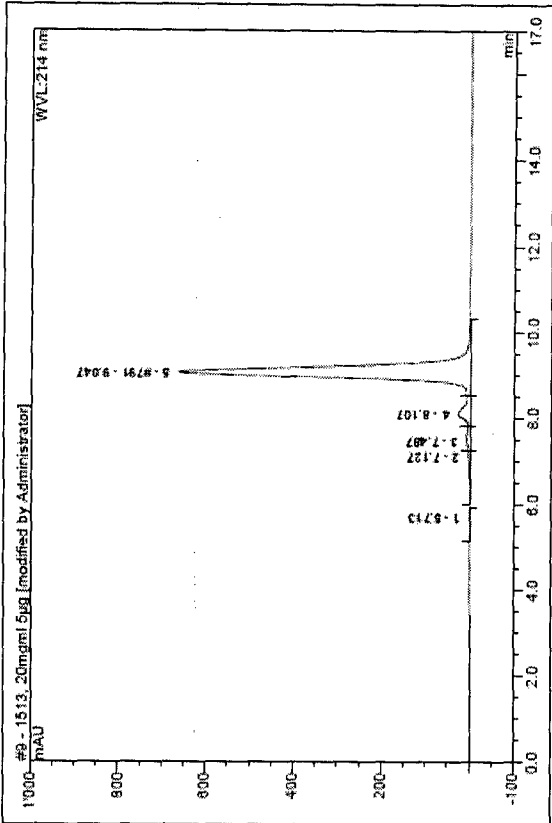


FIG. 8A

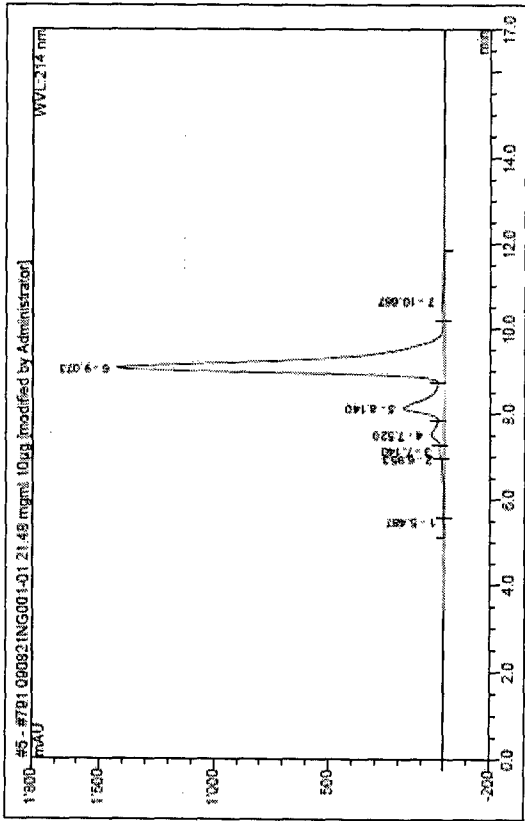
34rFW1.4_K47R



No.	Ret.Time min	Peak Name	Peak Width min	Area mAU*min	conc. 214nm mg/ml	Rel.Area %
1	5.71	n.a.	0.40	0.061	0.144	0.03
2	7.13	n.a.	1.04	1.840	0.268	0.91
3	7.49	n.a.	0.71	3.539	0.386	1.75
4	8.11	n.a.	0.51	9.839	0.824	4.86
5	9.05	#791	0.43	187.050	13.158	92.45
Total:			3.085	202.330	14.780	

FIG. 9B

34rFW1.4



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	conc. 214nm mg/ml	Inj.Vol. µl
1	5.49	n.a.	0.189	0.051	0.01	0.077	0.5
2	6.95	n.a.	12.394	5.352	0.88	0.275	0.5
3	7.14	n.a.	22.388	6.197	1.02	0.307	0.5
4	7.52	n.a.	55.428	22.675	3.72	0.924	0.5
5	8.14	n.a.	177.856	69.648	11.41	2.681	0.5
6	9.07	n.a.	1429.608	438.873	81.72	19.735	0.5
7	10.67	n.a.	7.947	7.625	1.25	0.360	0.5

FIG. 9A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2011/000256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/155723 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 30 December 2009 (2009-12-30)	18-27
Y	sequences 78-80,89,90,114,115 claims 4,32,33,37,42 example 4 table 3	1-17
Y	----- B. BAYNES ET AL.: "Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation.", BIOCHEMISTRY, vol. 44, no. 12, 29 March 2005 (2005-03-29), pages 4919-4925, XP002668296, U.S.A. abstract ----- -/-	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2012

Date of mailing of the international search report

09/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, Frans

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CH2011/000256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	F. KRISTOFFER ET AL.: "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 376, no. 4, 29 February 2008 (2008-02-29), pages 926-931, XP002668297, England abstract page 929, right-hand column, paragraph 2 -----	1-17
Y	WO 2009/000099 A2 (ESBATECH AG) 31 December 2008 (2008-12-31) claims 4,13,17,26 page 47, line 25 page 48, line 14 page 56, line 12 - line 17 table 16 -----	1-17
A	WO 2010/003268 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 14 January 2010 (2010-01-14) sequences 2,7,12,21,23,26 claims 6-9 -----	1-27
A	L. BORRAS ET AL.: "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 12, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 9054-9066, XP002668298, Baltimore, U.S.A. abstract -----	1-27
A	S. EWERT ET AL.: "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering.", METHODS, vol. 34, no. 2, October 2004 (2004-10), pages 184-199, XP004526805, San Diego, U.S.A. the whole document ----- -/--	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2011/000256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. HONEGGER ET AL.: "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modeling and analysis tool.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893, U.K. cited in the application the whole document	1-27
A	----- A. WÖRN ET AL.: "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 305, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 989-1010, XP004465987, U.K. the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CH2011/000256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009155723 A2	30-12-2009	AU 2009264564 A1 CA 2727992 A1 CN 102076716 A EP 2307457 A2 JP 2011525358 A KR 20110028516 A US 2011159007 A1 WO 2009155723 A2	30-12-2009 30-12-2009 25-05-2011 13-04-2011 22-09-2011 18-03-2011 30-06-2011 30-12-2009
WO 2009000099 A2	31-12-2008	AU 2008267734 A1 CA 2689941 A1 CN 101849001 A EP 2158315 A2 JP 2010531145 A KR 20100028575 A RU 2010102065 A US 2009074780 A1 WO 2009000099 A2	31-12-2008 31-12-2008 29-09-2010 03-03-2010 24-09-2010 12-03-2010 27-07-2011 19-03-2009 31-12-2008
WO 2010003268 A2	14-01-2010	AU 2009267729 A1 CA 2730178 A1 CN 102088958 A EP 2303230 A2 JP 2011527289 A KR 20110031373 A US 2011135644 A1 WO 2010003268 A2	14-01-2010 14-01-2010 08-06-2011 06-04-2011 27-10-2011 25-03-2011 09-06-2011 14-01-2010

ANTICUERPOS ESTABLES Y SOLUBLES

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 a las solicitudes de patente provisional de E.U.A. Nos. 61/405,798, presentada el 22 de octubre e 2010, y 61/484,749, presentada el 11 de mayo de 2011, los contenidos enteros de las cuales se incorporan a la presente por referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCION

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

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor alfa de necrosis tumoral (TNF α , también conocido como cachectina), es una citosina de mamífero que ocurre de manera natural producida por numerosos tipos celulares, incluyendo monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxina u otros estímulos. TNF α es un mediador principal de reacciones inflamatorias, inmunológicas y patofisiológicas (Grell, M., y otros (1995), *Cell*, 83: 793-802).

10 TNF α soluble se forma por el corte de una proteína de transmembrana de precursor (Kriegler, y otros (1988) *Cell* 53: 45-53), y los polipéptidos 17 kDa secretados se parecen a complejos de homotrímero solubles (Smith, y otros (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 6951-6954; para revisiones de TNFA, ver Butler y otros (1986), 15 *Nature* 320:584; Old (1986), *Science* 230:630). Estos complejos entonces unen a receptores encontrados en una variedad de células. La unión produce una distribución de efectos pro-inflamatorios, incluyendo (i) liberación de otras citocinas pro-inflamatorias tales como interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1, (ii) liberación de 20 metaloproteinasas de matriz y (iii) hasta regulación de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, amplificando más la cascada inflamatoria e inmune al atraer leucocitos en tejidos extravasculares.

Un número grande de trastornos está asociado con niveles elevados de TNF α , muchos de ellos de importancia médica 25 significativa. TNF α ha sido mostrado por regularse hacia arriba en un

número de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide (RA), trastornos del intestino inflamatorio incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerante, sepsis, fallo al corazón congestivo, asma bronquial y esclerosis múltiple. Ratones transgénicos para TNF α humano producen altos niveles de TNF α constitutivamente y desarrollan un poliartritis espontáneo, destructor que se parece a RA (Keffer y otros, 1991, EMBO J., 10, 4025-4031). Por lo tanto, TNF α es referido como una citosina pro-inflamatoria.

10 TNF α ahora está bien establecido como clave en la patogénesis de RA, que es una enfermedad crónica, progresiva y debilitante por inflamación y destrucción de articulaciones poliarticulares, con síntomas sistémicos de fiebre o malestar y fatiga. RA también conduce a inflamación sinovial crónica, con progreso frecuente a
15 cartílago articular y destrucción de huesos. Los niveles aumentados de TNF α se encuentran tanto en el fluido sinovial como la sangre periférica de pacientes que sufren de RA. Cuando se administran agentes bloqueadores de TNF α a pacientes que sufren de RA, reducen la inflamación, mejoran los síntomas y retrasan el daño a
20 articulaciones (McKown y otros (1999), *Arthritis Rheum.* 42:1204-1208).

Fisiológicamente, TNF α también se asocia con protección de infecciones particulares (Cerami y otros (1988), *Today* 9:28). TNF α se libera por macrófagos que han sido activados por
25 lipopolisacáridos de bacteria Gram-negativa. Como tal, TNF α parece

ser un mediador endógeno de importancia central involucrada en el desarrollo y patogénesis de choque endotóxico asociado con sepsis bacteriana (Michie, y otros (1989), *Br. J. Surg.* 76:670-671; Debets y otros (1989), *Second Vienna Shock Forum*, p. 463-466; Simpson y
 5 otros (1989) *Crit. Care Clin.* 5: 27-47; Waage y otros (1987), *Lancet* 1: 355-357; Hammerle y otros (1989) *Second Vienna Shock Forum* p. 715-718; Debets y otros (1989), *Crit. Care Med.* 17:489-497; Calandra y otros (1990), *J. Infect. Dis.* 161:982-987; Revhaug y otros (1988), *Arch. Surg.* 123: 162-170).

10 Como con otros sistemas de órgano, $\text{TNF}\alpha$ también ha sido mostrado por jugar un papel clave en el sistema nervioso central, en particular en trastornos inflamatorio y autoinmunes del sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre y miastenia grave, y en trastornos degenerativos del sistema
 15 nervioso, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. $\text{TNF}\alpha$ también está involucrado en trastornos de sistemas relacionados de la retina y de músculo, incluyendo neuritis óptica, degeneración macular, retinopatía diabética, dermatomiositis, esclerosis lateral amiotrófica,
 20 y distrofia muscular, así como en daños al sistema nervioso, incluyendo daño cerebral traumático, daño agudo a espina dorsal y embolia.

La hepatitis es otro trastorno inflamatorio relacionado con $\text{TNF}\alpha$ que entre otros detonantes puede ser causada por infecciones
 25 virales, incluyendo Epstein-Barr, citomegalovirus, y virus de hepatitis

A-E. La hepatitis causa inflamación aguda al hígado en la región portal y lobular, seguido por fibrosis y progreso tumoral. $\text{TNF}\alpha$ también puede mediar caquexia en cáncer, lo que causa la mayor parte de morbilidad y mortalidad de cáncer (Tisdale M.J. (2004),
5 Langenbecks Arch Surg. 389:299-305).

El papel clave desempeñado por $\text{TNF}\alpha$ en inflamación, respuestas inmunes celulares y la patología de muchas enfermedades ha conducido a la búsqueda por antagonistas de $\text{TNF}\alpha$. Una clase de antagonistas de $\text{TNF}\alpha$ diseñados para el
10 tratamiento de enfermedades mediadas con $\text{TNF}\alpha$ son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que específicamente se unen a $\text{TNF}\alpha$ y por tanto bloquean su función. El uso de anticuerpo anti- $\text{TNF}\alpha$ ha mostrado que un bloqueo de $\text{TNF}\alpha$ puede invertir los efectos atribuidos a $\text{TNF}\alpha$ incluyendo disminuciones en IL-1, GM-CSF, IL-6,
15 IL-8, moléculas de adhesión y destrucción de tejido (Feldmann y otros (1997), *Adv. Immunol.* 1997:283-350). Entre los inhibidores específicos de $\text{TNF}\alpha$ que recientemente se han hecho comercialmente disponibles incluyen un anticuerpo monoclonal, quimérico de ratón-humano dirigido contra $\text{TNF}\alpha$ (infliximab,
20 Remicade™; Centocor Corporation/Johnson & Johnson) ha demostrado eficacia clínica en el tratamiento de RA y enfermedad de Crohn. A pesar de estos avances, permanece una necesidad por formas nuevas y efectivas de anticuerpos u otros anticuerpos para el tratamiento para trastornos asociados con $\text{TNF}\alpha$ tal como RA. En

particular, hay una necesidad urgente por anticuerpos con propiedades funcionales óptimas para el tratamiento efectivo y continuo de artritis y otros trastornos mediados con $\text{TNF}\alpha$.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención provee anticuerpos que comprenden por lo menos una mutación reductora de agregación y métodos para producir dichos anticuerpos.

10

En un aspecto, la invención provee un método de reducir la propensión por agregación de un anticuerpo, el método que comprende introducir una o más modificaciones reductoras de agregación en una posición de residuo que participa en la interface entre la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de un anticuerpo, en donde la sustitución reduce la energía libre entre la

15 cadena ligera variable y la cadena pesada variable por al menos 0.5 kcal/mol, por tanto reduciendo la propensión de agregación del anticuerpo modificado comparado con aquél de un anticuerpo parental que carece de la modificación(es) reductora de agregación.

20

En un aspecto, un método de la invención comprende introducir una o más sustituciones de aminoácido en la interface de una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) del anticuerpo, en donde la una o más sustituciones están en posiciones de residuo seleccionadas para reducir la energía libre entre la VL y

25 VH por al menos 10%, así reduciendo la propensión de agregación

del anticuerpo comparado con un anticuerpo parental. En un aspecto particular, la secuencia de la cadena ligera variable del anticuerpo tiene al menos 65% de identidad a la secuencia de SEC ID NO: 1. En otros aspectos, la cadena pesada variable tiene por lo menos 85% de
5 identidad a la secuencia de SEC ID NO:3 o la secuencia de SEC ID NO: 4.

En ciertos aspectos, un método de la invención comprende modificar el residuo en la posición 50 AHo y/o el residuo en la posición 47 AHo en la cadena ligera variable de un anticuerpo, por
10 tanto reduciendo la propensión de agregación del anticuerpo comparado con un anticuerpo parental. En otros aspectos, el método de la invención comprende además modificar residuos en la posición AHo 12, 103 y 144 de la cadena pesada variable.

La invención también provee anticuerpos que tienen propensión
15 reducida para agregación que comprende una o más modificaciones reductoras de agregación. En ciertos aspectos, un anticuerpo de la invención es un fragmento Fab, Fab', un F(ab)2', Fv de una cadena (scFv), un Fv, o un anticuerpo lineal. En otros aspectos, la invención provee una molécula biespecífica o bivalente que comprende un
20 anticuerpo de la invención.

En otros aspectos, la modificación reductora de agregación está en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable. En un aspecto particular, la modificación reductora de agregación comprende una arginina (R) en la posición AHo 50 de la cadena
25 ligera variable. Todavía en otro aspecto, la modificación reductora

de agregación comprende una sustitución de lisina (K) por arginina (R) en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable.

Todavía en otros aspectos, la modificación reductora de agregación está en la posición AHo 47 de la cadena ligera variable.

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

10 La invención también provee anticuerpos estables y solubles específicos para $\text{TNF}\alpha$, los cuales comprenden secuencias específicas de cadena ligera y cadena pesada que se optimizan para estabilidad, solubilidad, unión *in vitro* o *in vivo* de $\text{TNF}\alpha$, y baja inmunogenicidad. Dichos anticuerpos están diseñados para el
15 diagnóstico y/o tratamiento de trastornos mediados con $\text{TNF}\alpha$. También se describen los ácidos nucleicos, vectores y células huésped para expresión de los anticuerpos recombinantes, cadenas ligeras variables y cadenas pesadas variables de la invención, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

20 La invención también provee métodos de tratar un trastorno mediado con $\text{TNF}\alpha$ que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti- $\text{TNF}\alpha$ de la invención. En ciertos aspectos, el trastorno mediado con $\text{TNF}\alpha$ es un trastorno ocular seleccionado a
25 partir del grupo que consiste de uveítis, enfermedad de Bechet,

retinitis, ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjörgen, neuropatía diabética, escleritis, degeneración macular relacionada con la edad y queratitis.

Modalidades preferidas específicas de la invención serán
5 evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas modalidades preferidas y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La figura 1 muestra curvas de titulación de posiciones de residuo VL47 (líneas sólidas) y VL50 (líneas punteadas) en dos moléculas scFv diferentes, 34rFW1.4 (negro) y 578rFW1.4 (gris).

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

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

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

La figura 3B muestra estabilidad de 34rFW1.4_VLK50R_DHP bajo condiciones aceleradas determinadas por análisis de SE-HPLC

después de 2 semanas de incubación a 40°C y usando concentración de 40 mg/ml.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Un objeto general de la invención es proveer anticuerpos estables y solubles teniendo propensión reducida para agregar en
5 solución. En una modalidad preferida dicho anticuerpo es un anticuerpo scFv o fragmento Fab. Los anticuerpos de la invención comprenden de preferencia una cadena ligera y pesada como se describe en la presente.

Los particulares mostrados en la presente son por medio de
10 ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de las modalidades preferidas de la presente invención solamente y son presentadas en la causa de proveer lo que se cree es la descripción más útil y prontamente entendida de los principios y aspectos conceptuales de varias modalidades de la invención. En este respecto, no se hace
15 ningún intento por mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de lo que es necesario para el entendimiento fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos y/o ejemplos haciendo evidentes a aquellos expertos en la técnica cómo las varias formas de la invención se pueden abarcar en la
20 práctica.

A fin de que la presente invención sea entendida mejor, ciertos términos serán definidos de la siguiente manera. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada. Las siguientes definiciones y explicaciones deben y pretenden estar
25 controlando en cualquier construcción futura a menos que se

modifiquen de manera clara y no ambigua en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado haga cualquier construcción sin sentido o en esencia sin sentido. En casos en donde la construcción del término lo haría sin sentido o en esencia sin sentido, la definición sería tomada del diccionario Webster, 3^a edición o un diccionario conocido a aquellos en la técnica, tal como el Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

El término “anticuerpo” como se usa en la presente incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “porción de unión a antígeno”, “polipéptido de unión a antígeno” o “inmunoaglutinante”) o una sola cadena del mismo. Un “anticuerpo” incluye una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una porción de unión de antígeno de los mismos. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están

más conservadas, denominadas regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas de terminal amino a terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “proteína de anticuerpo”) se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la habilidad de específicamente unir a un antígeno (por ejemplo, TNF). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_H , V_L , CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región de gozne; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un solo dominio o fragmento dAb (Ward y otros, (1989) *Nature* 341:544-546),

que consiste de un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) o (vii) una combinación de dos o más CDRs aisladas que opcionalmente se pueden juntar por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v , V_L y V_H , se codifican por genes separados, se pueden juntar, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite hacerse como una sola cadena de proteína en donde las regiones V_L y V_H forman pareja para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena única F_v (scFv); ver, por ejemplo, Bird y otros (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también deben estar abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas con experiencia en la técnica, y los fragmentos son seleccionados para utilidad en la misma manera como son anticuerpos intactos. Se pueden producir porciones de unión a antígeno por técnicas de ADN recombinante, o por corte enzimático o químico de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo, un IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), anticuerpo IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

El término “estructuras” se refiere a las porciones reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existen entre las regiones CDR más divergentes. Dichas regiones de estructura típicamente son referidas como estructuras 1 a 4 (FR1, FR2, FR3 y

FR4) y proveen un andamiaje para mantener, en espacio tridimensional, las tres CDRs encontradas en una región variable de anticuerpo de cadena pesada o ligera, de modo que las CDRs pueden formar una superficie de unión a antígeno. Dichas estructuras
5 también pueden ser referidas como andamiajes ya que proveen soporte para la presentación de las CDRs más divergentes. Otras CDRs y estructuras de la superfamilia de inmunoglobulina, tales como repeticiones de anquirina y fibronectina, se pueden usar como moléculas de unión a antígeno (ver también, por ejemplo, patentes
10 de E.U.A. Nos. 6,300,064, 6,815,540 y publicación de patente de E.U.A. No. 20040132028).

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

Los términos “unión específica”, “unión selectiva”,
20 “selectivamente une” y “específicamente une” se refieren a unión de anticuerpo a un epítopo en un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor, como se

determina usando tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE.

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

Como se usa en la presente, "identidad" se refiere a la comparación de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas es ocupada por la misma subunidad monomérica de base o aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN es ocupada por adenina, o una posición en cada uno de los dos polipéptidos es ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. La "identidad de porcentaje" entre dos secuencias es una función del número de posiciones de comparación compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 a 10 de las posiciones en dos secuencias se comparan, entonces las dos secuencias tienen 60% de identidad. Por medio de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten 50% de identidad (3 de las 6 posiciones totales son igualadas). Por lo

general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar máxima identidad. Dicha alineación se puede proveer usando, por ejemplo, el método de Needleman y otros (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado de manera conveniente por programas de computación tal como el programa Align (DNASTar, Inc.). La identidad de porcentaje entre dos secuencias de aminoácido también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1998)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalidad de longitud por cada gap (puntuación del alineamiento por cada hueco) de 12 y una penalidad por cada gap de 4. Además, la identidad de porcentaje entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Secuencias “similares” son aquellas que, cuando se alinean, comparten residuos de aminoácido idénticos y similares, en donde los residuos similares son sustituciones conservadoras para residuos de aminoácido correspondientes en una secuencia de referencia alineada. En este respecto, una “sustitución conservadora” de un residuo en una secuencia de referencia es una sustitución por un residuo que es física o funcionalmente similar al residuo de

referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño similar, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluyendo la habilidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. De esta manera, una “secuencia de sustitución conservadora” es una

5 que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre en cuanto a que están presentes una o más sustituciones conservadoras. La “similitud de porcentaje” entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen residuos de comparación o sustituciones conservadoras compartidas por las dos

10 secuencias divididas por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias se igualan y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservadoras, entonces las dos secuencias tienen 80% de similitud positiva.

Como se usa en la presente, el término “modificaciones de

15 secuencia conservadora” se debe referir a modificaciones de aminoácido que no afectan de manera negativa o alteran la características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido. Dichas modificaciones de secuencia conservadora incluyen sustituciones, adiciones y omisiones de nucleótido y

20 aminoácido. Por ejemplo, se pueden introducir modificaciones por técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como mutagénesis dirigida de sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácido conservadoras incluyen aquellas en donde el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que

25 tiene una cadena lateral similar. Las familias de aminoácidos con

5 cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina),
cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido
glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo,
glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína,
10 triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina,
valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas
laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina)
y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina,
triptófano, histidina). De esta manera, un residuo de aminoácido no
15 esencial predicho en un anticuerpo particular preferiblemente es
reemplazado con otro residuo de aminoácido de la misma familia de
cadena lateral. Los métodos de identificar nucleótido y sustituciones
conservadoras de aminoácido que no eliminan unión a antígeno son
bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Brummell y otros,
15 *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi y otros *Protein Eng.*
12(10):879-884 (1999); y Burks y otros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
94:412-417 (1997)).

“Secuencia de consenso de aminoácido” como se usa en la
presente se refiere a una secuencia de aminoácido que se puede
20 generar usando una matriz de por lo menos dos, y preferiblemente
más, secuencias de aminoácido alineadas, y permitiendo huecos en
la alineación, de modo que es posible determinar el residuo de
aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia de
consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que
25 son representados con más frecuencia en cada posición. En el caso

de que los dos o más aminoácidos sean representados de manera igual en una sola posición, la secuencia de consenso incluye ambos o todos de aquellos aminoácidos.

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

Sin embargo, se reconocerá que los aminoácidos de la misma clase pueden variar en grado por sus propiedades biofísicas. Por ejemplo, se reconocerá que ciertos grupos R hidrofóbicos (por ejemplo, alanina, serina o treonina) son más hidrofílicos (es decir, de mayor hidrofiliidad o menor hidrofobicidad) que otros grupos R hidrofóbicos (por ejemplo, valina o leucina). Se puede determinar la

hidrofilicidad o hidrofobicidad relativa usando métodos reconocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Rose y otros, *Science*, 229: 834-838 (1985) y Cornette y otros, *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

Como se usa en la presente, cuando una secuencia de aminoácido se alinea (por ejemplo, una primera secuencia de V_H o V_L) con una o más secuencias de aminoácido adicionales (por ejemplo, una o más secuencias de V_H o V_L en una base de datos), una posición de aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia de V_H o V_L) se puede comparar a una “posición correspondiente” en la una o más secuencias de aminoácido adicionales. Como se usa en la presente, la “posición correspondiente” representa la posición equivalente en la secuencia(s) siendo comparada cuando las secuencias se alinean óptimamente, es decir, cuando las secuencias se alinean para lograr una identidad de porcentaje más alta o similitud de porcentaje.

El término “molécula de ácido nucleico” se refiere a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de una cadena o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena. Un ácido nucleico se “liga operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se liga operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia. En ciertas modalidades, la invención provee moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo de la invención, una cadena ligera variable de la

invención y/o una cadena pesada variable de la invención. En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica: un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera teniendo por lo menos 97% de identidad a SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 14; un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada teniendo por lo menos 95% de identidad a SEC ID NO: 5; o un anticuerpo que tiene por lo menos 96% de identidad a SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 17.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un lazo de ADN de doble cadena circular en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de réplica autónoma en una célula huésped en donde se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos teniendo un origen bacteriano de réplica y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped al introducir en la célula huésped, y por tanto se replican junto con el genoma huésped.

El término “célula huésped” se refiere a una célula en donde un vector de expresión ha sido introducido. Las células huésped pueden incluir células bacterianas, microbianas, vegetales o animales. Bacteria, que son susceptibles a transformación, incluyen miembros

de la enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o Salmonela; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; neumococo; estreptococo; y *Haemophilus influenzae*. Los microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas de
5 célula huésped animal adecuadas incluyen CHO (líneas de ovario de hámster chino) y células NS0.

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

El término “trastorno mediado con TNF” por lo general se refiere a estados y/o síntomas de enfermedad asociados con TNF, incluyendo cualquier trastorno, el comienzo, progreso o la
20 persistencia de los síntomas del cual requiere la participación de TNF. Ejemplos de trastornos mediados con TNF incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, carcinomas de mama, carcinomas de pulmón,
25 carcinomas gástricas, carcinomas de esófago, carcinomas

colorectales, carcinomas de hígado, carcinomas de ovario, las comas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinoma del endometrio, hiperplasia del endometrio, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma
5 de nasofaringe, carcinomas de laringe, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernosa, hemangioblastoma, carcinomas de páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas,
10 rhabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiosarcomas, carcinomas de tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, carcinoma de célula renal, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada con facomatosas, edema (tal como aquella asociada con tumores cerebrales), síndrome de Meigs,
15 artritis reumatoide, psoriasis y aterosclerosis. Los trastornos mediados con TNF también incluyen ojo seco y condiciones inflamatorias relacionadas con $\text{TNF}\alpha$, tales como inflamación ocular, conjuntivitis alérgica, dermatitis, rinitis y asma, por ejemplo, e incluyen aquellos cambios celulares que resultan de la actividad de
20 $\text{TNF}\alpha$ que conduce directamente o indirectamente a la condición inflamatoria relacionada con $\text{TNF}\alpha$. Además, los trastornos mediados con TNF también incluyen angiogénesis ocular, enfermedad de Bechet, retinitis, glaucoma, síndrome de Sjörger, neuropatía diabética, escleritis, queratitis y uveítis.

El término “dosis efectiva” o “dosificación efectiva” se refiere a una cantidad suficiente para lograr o al menos parcialmente lograr el efecto deseado. El término “dosis terapéuticamente efectiva” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos
5 parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya sufre de la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad del trastorno siendo tratado y el estado general del sistema inmune propio del paciente.

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

Los sistemas de numeración como se usan en la presente para identificar posiciones de residuo e aminoácido en regiones variables
15 de cadena pesada y ligera de anticuerpo corresponden a aquél definido por A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670 (el sistema AHo). Las tablas de conversión entre el sistema AHo y el sistema más comúnmente usado como se define por Kabat y otros (Kabat, E. A., y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,
20 Quinta edición, Departamento de los Estados Unidos de Salud y Servicios Humanos, Publicación de NIH No. 91-3242) se proveen en A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

Como se usa en la presente, el término “agregación” se refiere al proceso de interacciones/asociaciones intermoleculares entre
25 moléculas monoméricas en solución líquida conduciendo a la

formación de especies oligoméricas. Se puede evaluar la agregación bajo condiciones de estrés usando estudios de estabilidad acelerada en una solución concentrada. Los estudios de estabilidad acelerada están diseñados para aumentar la velocidad de modificaciones de degradación, agregación o químicas de un compuesto al usar condiciones de almacenamiento extremas. Estudios de estabilidad acelerada, también conocidos como estudios de estrés, típicamente se realizan a 40°C y temperatura ambiente. Estos estudios de estabilidad proveen información valiosa con respecto al efecto de exposición a condiciones ambientales fuera de las condiciones de almacenamiento de marca normal, también conocidas como condiciones de estrés. Se usan ampliamente soluciones de alta concentración de proteína en la industria farmacéutica. El comportamiento de la solución de proteínas a concentraciones altas puede ser notablemente diferente de aquél predicho con base en análisis de solución diluida debido a no idealidad termodinámica en estas soluciones. La no idealidad observada en estos sistemas se relaciona con las interacciones de proteína-proteína (PPI). Tipos diferentes de fuerzas juegan un papel clave en determinar la naturaleza y grado globales de estos PPI y sus contribuciones relativas son afectadas por propiedades de disolución y solvente. El rol de PPI es impulsado por estas fuerzas intermoleculares para gobernar características de solución, incluyendo estabilidad física y auto-asociación de proteína y agregación. Las soluciones concentradas son aquellas soluciones en donde PPI afecta las

proteínas en solución al aumentar la velocidad de oligomerización. Una solución concentrada puede tener, por ejemplo, una concentración de proteína de por lo menos 10 mg/ml.

Los productos solubles de este proceso se pueden detectar con
5 métodos analíticos, tales como SE-HPLC. El término “modificación reductora de agregación” como se usa en la presente se refiere a una modificación, tal como una sustitución de aminoácido, que reduce la propensión de un anticuerpo de agregar en una solución líquida comparado con un anticuerpo parental como se describe en la
10 presente. Un anticuerpo “parental” es un anticuerpo que comprende en esencia la misma secuencia como el anticuerpo correspondiente que tiene modificaciones reductoras de agregación. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede tener las mismas CDRs como el anticuerpo modificado, y pueden tener la misma secuencia exacta como el
15 anticuerpo modificado excepto para residuos en posición AHo 47 y/o 50 en la secuencia de cadena ligera variable, y puede diferir además en las posiciones AHo 12, 103 y 144 en la secuencia de cadena pesada variable. Otras diferencias también pueden estar presentes, siempre y cuando el anticuerpo parental no contenga las
20 modificaciones reductoras de agregación presentes en el anticuerpo modificado de conformidad con un método de la invención.

El término “interface” como se usa en la presente se refiere a la interacción entre los dos dominios variables (dominios variables pesados y ligeros) de un anticuerpo. La interface incluye los
25 residuos de aminoácido que participan directa o indirectamente en la

interacción entre los dominios variables. Dicha interacción incluye, pero no se limita a, todas las clases de interacciones no unidas, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, unión de hidrógeno, términos electroestáticos e interacciones hidrofóbicas entre los dos dominios.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden usar en
10 la práctica o probando la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no deben ser limitantes.

15 Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que varias modalidades, preferencias y rangos se pueden combinar a voluntad. Además, dependiendo de la modalidad específica, definiciones seleccionadas, modalidades o rangos quizá no puedan aplicar.

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

 En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención se optimizan con una modificación(es) reductora de agregación relativa
25 a un anticuerpo parental, de modo que un anticuerpo de la invención

tiene una propensión reducida para agregar en comparación con un anticuerpo parental/no modificado. Dicha modificación(es) incluye sustituciones de aminoácido de residuos particulares que participan en la interface de cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH). En algunas modalidades, la modificación reductora de agregación comprende por lo menos una sustitución de aminoácido que reduce la energía libre de la interface de VL-VH del anticuerpo parental en una propuesta de modelación *in silico*, como se describe en la presente. Dichas modificaciones incluyen sustituciones de aminoácido de residuos particulares que contribuyen a la energía libre de la interface de VL-VH.

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

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

El sistema de numeración AHo se describe en detalle en Honegger, A. y Plückthun, A. (2001) J Mol. Biol. 309:657-670). La posición AHo 50 en la cadena ligera variable corresponde a la posición Kabat 42. La posición AHo 47 en la cadena ligera variable

corresponde a la posición Kabat 39. El sistema de numeración Kabat se describe más en Kabat y otros (Kabat, E. A. y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de los Estados Unidos de Salud y Servicios Humanos, 5 Publicación NIH No. 91-3242). Las tablas de conversión entre el sistema AHo y el sistema más comúnmente usado como se define por Kabat y otros se proveen en A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

Las siguientes tablas de conversión se proveen para dos 10 sistemas de numeración diferentes usados para identificar posiciones de residuo de aminoácido en regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo. El sistema de numeración Kabat se describe más en Kabat y otros (Kabat, E. A. y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de 15 los Estados Unidos de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242). El sistema de numeración AHo se describe más en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670).

Numeración de Región Variable de Cadena Pesada

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

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	44	51	87	101
2	2	45	52	88	102

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

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
26	27	66	77	*	127
*	28	67	78	*	128
27	29	68	79	*	129
28	30	69	80	*	130
29	31	70	81	*	131
30	32	71	82	*	132
31	33	72	83	*	133
32	34	73	84	*	134
33	35	74	85	*	135
34	36	75	86	*	136
35	37	76	87	101	137
35a	38	77	88	102	138
35b	39	78	89	103	139
*	40	79	90	104	140
*	41	80	91	105	141
*	42	81	92	106	142
36	43	82	93	107	143
37	44	82a	94	108	144
38	45	82b	95	109	145
39	46	82b	96	110	146
40	47	83	97	111	147
41	48	84	98	112	148
42	49	85	99	113	149
43	50	86	100		

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

10

Numeración de Región Variable de Cadena Ligera

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

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
1	1	43	51	83	101
2	2	44	52	84	102
3	3	45	53	85	103
4	4	46	54	86	104
5	5	47	55	87	105
6	6	48	56	88	106
7	7	49	57	89	107
8	8	50	58	90	108
9	9	*	59	91	109
10	10	*	60	92	110

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
11	11	*	61	93	111
12	12	*	62	94	112
13	13	*	63	95	113
14	14	*	64	95a	114
15	15	*	65	95b	115
16	16	*	66	95c	116
17	17	51	67	95d	117
18	18	52	68	95e	118
19	19	53	69	95f	119
20	20	54	70	*	120
21	21	55	71	*	121
22	22	56	72	*	122
23	23	57	73	*	123
24	24	58	74	*	124
25	25	59	75	*	125
26	26	60	76	*	126
27	27	61	77	*	127
*	28	62	78	*	128
27a	29	63	79	*	129
27b	30	64	80	*	130
27c	31	65	81	*	131
27d	32	66	82	*	132
27e	33	67	83	*	133
27f	34	68	84	*	134

Kabat	AHo	Kabat	AHo	Kabat	AHo
*	35	*	85	*	135
28	36	*	86	*	136
29	37	69	87	96	137
30	38	70	88	97	138
31	39	71	89	98	139
32	40	72	90	99	140
33	41	73	91	100	141
34	42	74	92	101	142
35	43	75	93	102	143
36	44	76	94	103	144
37	45	77	95	104	145
38	46	78	96	105	146
39	47	79	97	106	147
40	48	80	98	107	148
41	49	81	99	108	149
42	50	82	100		

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

sistema de numeración AHo para la posición indicada en la columna 5.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender modificaciones adicionales según se desee. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender sustituciones de aminoácido para reducir su inmunogenicidad *in vivo* de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente de E.U.A. No. 12/973,968 y/o sustituciones para potenciar la solubilidad del anticuerpo, como se describe en WO 09/155725. De esta manera, en una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende Serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); Serina (S) o Treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y/o Serina (S) o Treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). Adicionalmente, el anticuerpo puede comprender Serina (S) o Treonina (T) en las posiciones 97, 98 y/o 99 de cadena pesada (numeración AHo). Preferiblemente, el anticuerpo comprende Serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), Treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y Treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

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

SEC ID NO. 1:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGRAPKLLIY

(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)_{n=1-}

5₅₀FGQGTKLTVLG

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

10 SEC ID NO. 2:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAP

KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGN

ENTGDRYAFGQGTKLTVLG

15

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

SEC ID NO. 3: estructura de cadena pesada variable

20

EVGLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWG

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

₅₀WGQGTLLTVSS

Todavía en otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la estructura de cadena pesada variable

SEC ID NO. 4:

5

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

10 En una modalidad preferida, el anticuerpo de la invención comprende la cadena pesada variable (las CDRs están subrayadas):

SEC ID NO. 5:

15

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGL
EWVGCIYGDNDITPLYANWAKGRRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAE
DTAYYCARLGYADYAYDLWGQGTTTVTVSS

20 Como se usa en la presente, los residuos X son sitios de inserción de CDR, X puede ser cualquier aminoácido que ocurre de manera natural; pueden estar presentes por lo menos tres y hasta 50 aminoácidos.

25 En una modalidad, la estructura de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende SEC ID NO: 1 y la estructura de cadena pesada variable comprende SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 4.

En otra modalidad, la estructura de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene por lo menos 65% de identidad, más preferible por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% identidad, a SEC ID NO: 1. Muy preferible, dicha secuencia tiene una arginina (R) en la posición 50 AHo. En otra modalidad, dicha secuencia tiene una arginina (R) en la posición 47 AHo.

En otra modalidad, la estructura de cadena pesada variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad, más preferible por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% de identidad, a SEC ID NO. 3. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende Serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), Treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y Treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

En otra modalidad, la estructura de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene por lo menos 97%, 98%, más preferible 99% de identidad, a SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 4.

En otra modalidad, la estructura de cadena pesada variable de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% de identidad, SEC ID NO: 5.

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia que tiene por lo menos 96%, 97%, 98%, más preferible 99% de identidad, a SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 17.

En otra modalidad, la estructura de cadena ligera variable de un anticuerpo de la invención comprende SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 14, y la estructura de cadena pesada variable comprende SEC ID NO: 5.

En una modalidad, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención son anticuerpos de una cadena (scFv) o fragmentos Fab. En el caso de anticuerpos scFv, un dominio de VL se puede entrelazar a un dominio de VH en cualquier orientación por un enlazador flexible. Un estado adecuado del enlazador de la técnica consiste de secuencias de aminoácido GGGGS repetidas (SEC ID NO: 6) o variantes de las mismas. En una modalidad preferida de la presente invención, se usa un enlazador (GGGGS)₄ (SEC ID NO:7) o su derivado, pero variantes de 1-3 repeticiones también son posibles (Holliger y otros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Otros enlazadores que se pueden usar para la presente invención se describen por Alfthan y otros (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi y otros (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106, Hu y otros (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov y otros (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 y Roovers y otros (2001), *Cancer Immunol. Immunother.* 50:51-59. La distribución puede ser VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL, con la primera orientación siendo la preferida. En el caso de fragmentos Fab, los dominios variables de cadena ligera

seleccionados VL se fusionan a la región constante de una cadena de Ig kappa humano, mientras que los dominios variables de cadena pesada VH adecuados se fusionan al primer dominio constante (N-terminal) CH1 de un IgG humano. En la terminal C, se forma un
 5 puente de disulfuro de inter-cadena entre los dos dominios constantes.

De esta manera, en una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

10 SEC ID NO. 8:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGRAPKLLIY
 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC(X)_{n=1-}
 50FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
 15 PGGSRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-}
 50RFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-}
 50WGQGTLVTVSS

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la
 20 secuencia:

SEC ID NO. 9:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY
 25 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC(X)_{n=1-}

₅₀FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
 PGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-}
₅₀RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-}
₅₀WGQGTLLTVSS

5

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

SEC ID NO. 10:

10

(34rFW1.4_VL_K50R_DHP):

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGRAP
 KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQGN
 FNTGDRYAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCI
 YGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYC
 ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

15

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

SEC ID NO. 11: estructura de cadena ligera variable de FW1.4
 (K127)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGKAPKLLIY
 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

- 5 En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable:

SEC ID NO. 12: estructura de cadena ligera variable sustituida de FW1.4

10

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=1-50}WYQQKPGKAPKLLIY
 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

- 15 Todavía en otra modalidad preferida, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

SEC ID NO. 13:

- 20 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC (X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY
 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYC (X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

- 25 En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la cadena ligera variable (las CDRs están subrayadas):

SEC ID NO. 14:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQRPGKAP
 KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQGN
 5 ENTGDRYAFGQGTKLTVL

De esta manera, en una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la secuencia:

10 SEC ID NO. 15:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY
 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-}
 50FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
 15 PGGSRLSCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-}
 50RFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-}
 50WGQGTLLTVSS

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende la
 20 secuencia:

SEC ID NO. 16:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50}WYQQRPGKAPKLLIY
 25 (X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-}

₅₀FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
 PGGSRLSCTVS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-}
₅₀RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-}
₅₀WGQGTLLTVSS

5

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

SEC ID NO. 17:

10

(34rFW1.4_VL_K47R_DHP):

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQRPGKAP
 KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQGN
 FNTGDRYAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGSVQPGGSRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCI
 YGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYC
 ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

15

Todavía en otra modalidad, un anticuerpo de la invención
 20 comprende la secuencia:

SEC ID NO. 18:

(34rFW1.4)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGKAP
 KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGN
 FNTGDRYAFIGGQTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCI
 5 YGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYC
 ARLGYADYAYDLWGQGTTVTVSS

En una modalidad, la VL de un anticuerpo parental es o
 comprende SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 12 o una secuencia que
 10 tiene por lo menos 65% de identidad, más preferible 80%, 85%, 90%,
 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 11 o SEC ID
 NO: 12. En otra modalidad preferida, la VH del anticuerpo parental
 es o comprende SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 4 una secuencia que
 tiene por lo menos 80% de identidad, más preferible 85%, 90%, 95%,
 15 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 4.

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

La presente invención también muestra moléculas bivalentes y
 biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-TNF α , o un
 25 fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención,

o porciones de unión a antígeno del mismo, se pueden derivar o enlazar a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que une a por lo menos dos
5 sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención se puede derivar o enlazar a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; dichas moléculas multiespecíficas también deben estar abarcadas por el término
10 “molécula biespecífica” como se usa en la presente. Ejemplos no limitantes de moléculas biespecíficas incluyen un diacuerpo, un diacuerpo de una cadena, y un anticuerpo tándem, como es sabido a aquellos expertos en la técnica.

Para crear una molécula biespecífica de la invención, un
15 anticuerpo de la invención se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o diferente) a una o más otras moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, antígenos específicos tumorales o específicos patógenos, péptido o mimética
20 de unión, de modo que resulta una molécula biespecífica. Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera molécula de unión teniendo especificidad para $\text{TNF}\alpha$ y una segunda molécula de unión teniendo especificidad para uno o más epítopos diana adicionales.

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden una especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de una cadena. El anticuerpo también
5 puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de una cadena como se describe en Ladner y otros, patente de E.U.A. No. 4,946,778, los contenidos de la cual se incorpora expresamente a la presente por referencia.

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

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se
15 pueden preparar al conjugar las especificidades de unión constituyentes usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar
20 una variedad de acoplamiento o agentes entrelazadores para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrelazamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenileno-dimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato
25 (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfo-

succinimidilo (sulfo-SMCC) (ver, por ejemplo, Karpovsky y otros (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA y otros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan y otros (1985) *Science* 229:81-83), y Glennie y otros (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Agentes conjugadores preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar vía unión de sulfhidrilo, por ejemplo, vía las regiones de gozne de terminal C de las dos cadenas pesadas u otros sitios, ya sea que ocurran de manera natural o se introducen artificialmente. En una modalidad particularmente preferida, la región de gozne se modifica para contener un número non de residuos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector y expresar y ensamblar en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil en donde la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab proteína de fusión. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de una cadena que comprende un anticuerpo de una cadena y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de una cadena que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de una cadena. Además, una molécula biespecífica puede ser un scFv que específicamente se une

a una primera diana, en donde la VH y VL de dicho scFv se enlazan con un enlazador flexible que comprende un dominio que provee unión específica a una segunda diana. Se describen enlazadores adecuados, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2010/006454. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas, por ejemplo, en la patente de E.U.A. No. 5,260,203; patente de E.U.A. No. 5,455,030; patente de E.U.A. No. 4,881,175; patente de E.U.A. No. 5,132,405; patente de E.U.A. No. 5,091,513; patente de E.U.A. No. 5,476,786; patente de E.U.A. No. 5,013,653; patente de E.U.A. No. 5,258,498; y patente de E.U.A. No. 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar, por ejemplo, por ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento), o por ensayo inmunoblot. Cada uno de estos ensayos en general detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular al emplear un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, se pueden detectar los complejos de TNF-anticuerpo usando, por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y específicamente une a los complejos de anticuerpo-TNF. Alternativamente, se pueden detectar los complejos usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar radioactivamente y se usa en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles*

of Radioimmunoassays, Séptimo Curso de Entrenamiento en Técnicas de Ensayo de Radioligando, La Sociedad Endócrina, Marzo 1986, que se incorpora a la presente por referencia). El isótopo radioactivo se puede detectar por dicho medio como el uso de un contador γ o un
5 contador de centelleo o por autoradiografía.

En otro aspecto, la invención provee un método para producir los anticuerpos descritos en la presente. Los métodos para producir anticuerpos que tienen propensión reducida para agregar en solución como se provee en la presente se basan en la observación
10 sorprendente que a través de la modulación de la interacción de dominio de anticuerpo entre la propensión de agregación de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos se puede reducir, y que mutaciones reductoras de agregación se pueden predecir confiablemente al determinar la energía libre de la interface de
15 VL/VH definida como la diferencia entre la energía del anticuerpo (tal como un scFv) y los dominios variables individuales. Como se muestra en la presente, sustituciones reductoras de agregación que modulan interacción de dominio de anticuerpo al reducir la energía libre entre los dominios variables se pueden hacer sin afectar la
20 estabilidad o actividad de unión del anticuerpo.

En una modalidad, un método de la invención comprende los pasos de:

- (i) proveer un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH);

- (ii) identificar una o más posiciones de residuo que participan en la interface entre la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH) del anticuerpo; y
- (iii) modificar el anticuerpo al introducir una sustitución en la posición(es) de residuo identificado de modo que la sustitución(es) reduce la energía libre entre los dominios de VL y los de VH por al menos 0.5 kcal/mol, preferiblemente por lo menos 1.0 kcal/mol, y muy preferible al menos 2.0 kcal/mol (es decir, la energía libre entre los dominios de VL y VH con la sustitución es por lo menos 0.5 kcal/mol menos que la energía libre entre los dominios de VL y VH correspondientes que no comprenden la sustitución de aminoácido), por tanto reduciendo la propensión de agregación del anticuerpo modificado en comparación con aquél de un anticuerpo parental.

Como se delineó antes, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un Fab, un F(ab)'₂, Fv de una cadena (scFv), un fragmento Fv, un diacuerpo, un diacuerpo de una cadena, un anticuerpo tándem, o un anticuerpo lineal; en una modalidad preferida, el anticuerpo es un Fv de una cadena (scFv).

En una modalidad preferida, la identificación de la una o más posiciones de residuo que participan en la interface entre la cadena ligera variable y la cadena pesada variable del anticuerpo (es decir,

paso (ii)) involucra la determinación de la energía libre entre la interface de VL – VH. Esto se puede realizar al usar programas bioinformáticos comúnmente conocidos. Un ejemplo de un programa bioinformático adecuado es CHARMM (Chemistry at HARvard
 5 Macromolecular Mechanics – Química en Mecánica Macromolecular de Harvard).

Para el propósito de determinar la energía libre entre la interface de VL – VH, típicamente, se provee una presentación molecular atomística completa de la proteína. La energía libre de la
 10 interface es la diferencia de energía entre el anticuerpo entero que comprende ambos dominios variables VL y VH y la suma de las energías de los dominios individuales en el contexto de un método solvente implícito. Esto involucra tres cálculos de energía únicos, (1) en el anticuerpo G(a); (2) en la VL G(b); y (3) en la VH G(c). Por
 15 consiguiente, la energía libre de la interface es

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

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

La determinación de energía libre puede comprender además el paso de simular la distribución de carga de la proteína. Dicha distribución de carga se puede simular con base en fuerzas electroestáticas o de van der Waals.

Para determinar una modificación adecuada, uno o más residuos de aminoácido que participan en la interface se pueden elegir para sustitución. Por ejemplo, un modelo molecular de la proteína que comprende la una o más sustituciones (por ejemplo, 5 cambiar uno o más residuos a alanina) en las posiciones seleccionadas se genera y se determina la energía libre de la interface de la presentación molecular sustituida. si la energía libre de la interface del modelo molecular sustituido es menor que la energía libre de la interface del modelo molecular inicial, el residuo 10 de aminoácido se selecciona para sustitución. Dentro del contexto de CHARMM, se pueden construir mutaciones, por ejemplo, con el protocolo Build Mutants. La una o más sustituciones en el modelo molecular puede estar en las posiciones que son conocidas o se sospecha están involucradas en la interface de VL/VH.

15 En una modalidad, se realiza un paso adicional de minimización de energía del modelo molecular que comprende la una o más sustituciones en la posición(es) seleccionada en el área alrededor de la mutación(es). Dicha área se puede ajustar a 10 Angstroms.

En una modalidad, una posición de residuo identificada para 20 sustitución es ocupada por un aminoácido cargado.

Un anticuerpo producido por un método de la invención puede comprender cualquier cadena ligera o cadena pesada variable adecuada como es sabido en la técnica, y comprende de preferencia al menos una CDR de un anticuerpo de conejo. En la presente se 25 describen ciertas cadenas ligeras y pesadas variables preferidas.

Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender: una estructura de anticuerpo VL teniendo por lo menos 65% de identidad, más preferible 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 12, que comprende además
5 arginina (R) en la posición AHo 47 y/o en la posición AHo 50 de la cadena ligera variable; y una estructura de anticuerpo VH teniendo por lo menos 80% de identidad, más preferible, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 3.

La modificación de la una o más posiciones de residuo se hace
10 preferiblemente de conformidad con las enseñanzas de PCT/CH2008/000285, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. En breve, para un subtipo de anticuerpo dado, ciertos aminoácidos están presentes en posiciones de residuo específicas de la estructura de anticuerpo. Por ejemplo,

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

- (i) glutamina (Q) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (ii) glutamina (Q) en la posición 6 de aminoácido usando
20 sistema de numeración AHo o Kabat;
- (iii) treonina (T) o alanina (A) en la posición 7 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (iv) alanina (A), valina (V) o fenilalanina (F) en la posición 89 de aminoácido usando sistema de numeración AHo

(posición 78 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat); y/o

5 (v) arginina (R), glutamina (Q), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) o fenilalanina (F) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 89 de aminoácido usando numeración Kabat);

b) para una región variable de cadena pesada de la familia de VH1a humano, los aminoácidos preferidos son:

10 (i) ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;

(ii) ácido glutámico (E) en la posición 6 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;

15 (iii) leucina (L) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

(iv) metionina (M) en la posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

20 (v) ácido glutámico (E) o glutamina (Q) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

(vi) leucina (L) en la posición 19 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 18 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

- (vii) isoleucina (I) en la posición 21 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (viii) fenilalanina (F), serina (S), histidina (H) o ácido aspártico (D) en la posición 90 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 79 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (ix) ácido aspártico (D) o glutamina (Q) en la posición 92 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 81 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (x) glicina (G), asparagina (N) o treonina (T) en la posición 95 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 82b de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (xi) treonina (T), alanina (A), prolina (P) o fenilalanina (F) en la posición 98 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 84 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- c) para una región variable de cadena pesada de la familia de VH1b humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
 - (ii) treonina (T), prolina (P), valina (V) o ácido aspártico (D) en la posición 10 de aminoácido usando sistema de

- numeración AHo (posición 9 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 5 (iii) leucina (L) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (iv) valina (V), arginina (R), glutamina (Q) o metionina (M) en la posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 10 (v) ácido glutámico (E), arginina (R) o metionina (M) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 13 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 15 (vi) arginina (R), treonina (T) o asparagina (N) en la posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 19 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 20 (vii) isoleucina (I), fenilalanina (F) o leucina (L) en la posición 21 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (viii) lisina (K) en la posición 45 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 38 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

- (ix) treonina (T), prolina (P), valina (V) o arginina (R) en la posición 47 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 40 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 5 (x) lisina (K), histidina (H) o ácido glutámico (E) en la posición 50 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 43 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (xi) isoleucina (I) en la posición 55 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 48 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 10 (xii) lisina (K) en la posición 77 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 66 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 15 (xiii) alanina (A), leucina (L) o isoleucina (I) en la posición 78 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 67 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (xiv) ácido glutámico (E), treonina (T) o alanina (A) en la posición 82 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 71 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 20 (xv) treonina (T), serina (S) o leucina (L) en la posición 86 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 75 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 25

- (xvi) ácido aspártico (D), asparagina (N) o glicina (G) en la posición 87 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 76 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 5 (xvii) asparagina (N) o serina (S) en la posición 107 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 93 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- d) para una región variable de cadena ligera de la familia de Vkappa1 humano, los aminoácidos preferidos son:
- 10 (i) ácido glutámico (E) o isoleucina (I) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (ii) valina (V) o isoleucina (I) en la posición 3 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (iii) valina (V), leucina (L) o isoleucina (I) en la posición 4 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- 15 (iv) glutamina (Q) en la posición 24 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (v) arginina (R) o isoleucina (I) en la posición 47 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 39 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 20 (vi) arginina (R), ácido glutámico (E), treonina (T), metionina (M) o glutamina (Q) en la posición 50 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 42 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);

- (vii) histidina (H), serina (S) o fenilalanina (F) en la posición 57 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 49 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 5 (viii) fenilalanina (F) en la posición 91 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 73 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (ix) valina (V), serina (S), glicina (G) o isoleucina (I) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 10
- e) para una región variable de cadena ligera de la familia de Vkappa3 humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) treonina (T) en la posición 2 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- 15
- (ii) treonina (T) en la posición 3 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (iii) isoleucina (I) en la posición 10 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- 20
- (iv) tirosina (Y) en la posición 12 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (v) serina (S) en la posición 18 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (vi) alanina (A) en la posición 20 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- 25

- (vii) metionina (M) en la posición 56 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 48 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (viii) valina (V) o treonina (T) en la posición 74 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 58 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (ix) asparagina (N) en la posición 94 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 76 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (x) tirosina (Y) o serina (S) en la posición 101 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 83 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
 - (xi) leucina (L) o alanina (A) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- f) para una región variable de cadena ligera de la familia de Vlambda1 humano, los aminoácidos preferidos son:
- (i) leucina (L), serina (S) o ácido glutámico (E) en la posición 1 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
 - (ii) alanina (A), prolina (P), isoleucina (I) o tirosina (Y) en la posición 2 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
 - (iii) valina (V) o metionina (M) en la posición 4 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;

- (iv) ácido glutámico (E) en la posición 7 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (v) alanina (A) en la posición 11 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- 5 (vi) treonina (T) o serina (S) en la posición 14 de aminoácido usando sistema de numeración AHo o Kabat;
- (vii) histidina (H) en la posición 46 de aminoácido usando sistema de numeración AHo 46 (posición 38 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 10 (viii) treonina (T), serina (S), asparagina (N), glutamina (Q) o prolina (P) en la posición 53 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 45 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 15 (ix) arginina (R) o glutamina (Q) en la posición 82 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 66 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- (x) glicina (G), treonina (T) o ácido aspártico (D) en la posición 92 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 74 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat);
- 20 (xi) valina (V), treonina (T), histidina (H) o ácido glutámico (E) en la posición 103 de aminoácido usando sistema de numeración AHo (posición 85 de aminoácido usando sistema de numeración Kabat).

Por consiguiente, las sustituciones hechas en el presente método siguen preferiblemente las enseñanzas de PCT/CH2008/000285. La determinación de subtipo es conocida al experto en la técnica.

5 En una modalidad, un método de la invención comprende modificación de un anticuerpo en la posición 47 y/o 50 AHo de la cadena ligera variable, en particular de una cadena ligera variable de $V\kappa$ 1. Preferiblemente, el anticuerpo se modifica para comprender arginina (R) en la posición 47 AHo y/o posición 50 AHo
10 de la cadena ligera variable. En algunas modalidades, lisina (K) se sustituye por arginina (R) en la posición 47 AHo y/o posición 50 AHo de la cadena ligera variable. Ya que los anticuerpos de la invención pueden comprender modificaciones adicionales según se desee, los métodos de la invención pueden comprender el paso adicional de
15 modificar el anticuerpo tal como para comprender Serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); Serina (S) o Treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo). Adicionalmente, el anticuerpo se puede modificar para comprender Serina (S) o Treonina (T) en las posiciones 97, 98 y/o 99 de cadena
20 pesada (numeración AHo). Preferiblemente, el método comprende el paso de modificar el anticuerpo para comprender Serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), Treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y Treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo).

La invención provee además un método de generar un anticuerpo humanizado con una propensión baja para agregar en solución, el método que comprende seleccionar una estructura de cadena ligera variable que comprende arginina (R) en la posición 47 AHo y/o en la posición 50 AHo. El método puede comprender además seleccionar una estructura de cadena pesada variable que comprende una serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo); serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo) y/o serina (S) o treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). En una modalidad, una estructura identificada con base en un criterio de selección elegido se puede modificar más con una modificación reductora de agregación de la invención. Por ejemplo, si se identifica una estructura de cadena ligera variable que tiene una arginina (R) en la posición 50, el residuo en la posición AHo se puede sustituir con un aminoácido diferente, tal como arginina (R), o si se identifica una cadena pesada variable que tiene una serina (S) en la posición 12 AHo, los residuos en las posiciones 103 y 144 AHo se pueden sustituir con treoninas.

Como se usa en la presente, un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que comprende CDRs no humanas y secuencias de estructura de humano o cadena pesada variable derivada de humano y/o de humano o cadena ligera variable derivada de humano. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la técnica. En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende por lo menos una, y

preferiblemente seis, CDRs de un anticuerpo producido en un conejo o seleccionado a partir de una colección de CDR.

Se pueden seleccionar las estructuras de anticuerpo variable a partir de, por ejemplo, una base de datos (tal como la base de datos

5 Kabat, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), VBASE2 (<http://vbase2.org/>), la base de datos Kabat de secuencias de proteínas de interés inmunológico (<http://www.kabatdatabase.com/index.html>), el recurso de proteína universal (UniProt; <http://pir.georgetown.edu/>), y base de

10 datos Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), con base en identidad y/o similitud con las secuencias de estructura variable del anticuerpo del cual las CDRS se originaron, y con base en secuencia(s) de estructura de lo contrario preferida.

Varios programas de computación están disponibles para

15 buscar secuencias de estructura humana adecuadas que cumplan el requerimiento(s) seleccionado. Por ejemplo, "KabatMan" es una versión que se puede buscar en computadora de los datos de secuencia de anticuerpo Kabat del libro *Sequences of Immunological Interest*. El programa KabatMan es descrito en el documento: Martin

20 (1996) "Accessing the Kabat Antibody Sequence Database" por *Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **25**, 130-133, y esta disponible en <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>, y <http://www.bioinf.org.uk/abs/kabatman.html>. La base de datos Abysis, en <http://www.bioinf.org.uk/abysis/>, integra datos de secuencia de

25 Kabat, IMGT y PDB con datos estructurales de la PDB. Provee una

interface comprensiva de apuntar y hacer clic que permite a una persona buscar los datos de secuencia en varios criterios y mostrar resultados en formatos diferentes. Para datos de la PDB, se pueden combinar búsquedas de secuencia con restricciones estructurales.

5 En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo generado por el método descrito en la presente. En una modalidad preferida, dicho anticuerpo comprende una estructura de anticuerpo VL teniendo por lo menos 80% de identidad, más preferible 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 12 o SEC ID
10 NO: 13; preferiblemente, el anticuerpo comprende arginina (R) en la posición 47 AHo y/o en la posición 50 AHo de la cadena ligera variable.

 Adicional o alternativamente, la estructura de anticuerpo VH es o comprende SEC ID NO: 3 o una secuencia que tiene por lo menos
15 80% de identidad, más preferible, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferible 99% a SEC ID NO: 3.

En ciertas modalidades, la invención provee además

- (1) Un método para reducir la propensión de agregación de un anticuerpo siendo un complejo heterodimérico que
20 comprende dominios variables pesados y ligeros, el método que comprende los pasos de:
- (a) proveer una presentación molecular atomística completa del anticuerpo;
 - (b) determinar la energía libre de la interface entre
25 ambos dominios;

- 5 (c) elegir uno o más residuos de aminoácido que participan en la interface para sustitución al proveer un modelo molecular del anticuerpo que comprende la una o más sustituciones en las posiciones seleccionadas y determinando la energía libre de la interface de la presentación molecular sustituida;
- 10 (d) seleccionar un residuo de aminoácido para sustitución si la energía libre de la interface del modelo molecular sustituido es menor que la energía libre de la interface del modelo molecular inicial;
- 15 (2) Un método de (1), en donde la energía libre de la interface se determina al calcular la diferencia de energía entre el complejo y la suma de las energías de los dominios individuales en el contexto de un método de solvente implícito;
- (3) El método de (2), en donde el solvente es GBMV o PBSA;
- (4) El método de cualquiera de (1)-(3) precedentes, que comprende además el paso de
- 20 (i) simular la distribución de carga de la proteína, en donde dicho paso se realiza dentro del paso a y b;
- (5) El método de (4), en donde la distribución de carga se simula con base en fuerzas electroestáticas o de van der Waals;

- (6) El método de cualquiera de (1)-(5) precedentes, en donde el paso (c) comprende el paso adicional de minimización de energía en el área alrededor de la mutación;
- (7) El método de cualquiera de (1)-(7) precedentes, en donde el anticuerpo es un fragmento variable de una cadena (scFv).

Se pueden generar anticuerpos de la invención usando técnicas de rutina en el campo de genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, los cADNs codificándolos se pueden generar por síntesis genética por métodos bien conocidos en la técnica. Estos cADNs se pueden clonar en plásmidos de vector adecuados.

Las técnicas estándar de clonación y mutagénesis bien conocidas al experto en la técnica se pueden usar para agregar enlazadores, dominios de traslado o fusiones de construcción para la producción de fragmentos Fab. Se describen protocolos básicos que describen los métodos generales de esta invención en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 3^a ed. 2001) y en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y otros, 1999).

La secuencia de ADN que alberga un gen codificando un polipéptido scFv, o en el caso de fragmentos Fab, codificando dos genes separados o un operón bi-cistrónico que comprende los dos genes para las fusiones de VL-Ck y VH-CH1 se clonan en un vector de expresión adecuado, preferiblemente uno con un promotor

inducible. Se debe tener cuidado que frente a cada gen hay un sitio de unión de ribosoma apropiado que asegura traducción. Se debe entender que los anticuerpos de la presente invención comprenden las secuencias descritas en vez de que consistan de ellas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir que una construcción esté hecha de lo que un anticuerpo con uno o pocos residuos adicionales en la termina N están presentes. Específicamente, la metionina derivada del codón de inicio puede estar presente en la proteína final en casos en donde no se ha cortado de manera post-traducción. La mayoría de las construcciones para anticuerpos scFv dan lugar a una alanina adicional en el extremo terminal N. En una modalidad preferida de la presente invención, un vector de expresión para expresión periplásmica en *E. coli* se elige (Krebber, 1997). Dicho vector comprende un promotor frente a una secuencia de señal que se puede cortar. La secuencia codificadora para el péptido de anticuerpo entonces se fusiona en marco a la secuencia de señal que se puede cortar. Esto permite la focalización del polipéptido expresado al periplasma bacteriano en donde se corta la secuencia de señal. Entonces se dobla el anticuerpo. En el caso de los fragmentos Fab, tanto los péptidos de fusión VL-CK como VH-CH1 se deben enlazar a una señal de exportación. El enlace S-S covalente se forma en las cisteínas de terminal C después de que los péptidos hayan alcanzado el periplasma. Si se prefiere expresión citoplásmica de anticuerpos, dichos anticuerpos usualmente se pueden obtener a rendimientos

altos de cuerpos de inclusión, que se pueden separar con facilidad de otros fragmentos celulares y proteína. En este caso, los cuerpos de inclusión se solubilizan en un agente desnaturizante tal como, por ejemplo, clorhidrato de guanidina (GndHCl) y después se vuelve a doblar por procedimientos de renaturación bien conocidos a aquellos expertos en la técnica.

Los plásmidos que expresan los polipéptidos scFv o Fab son introducidos en un huésped adecuado, preferiblemente una célula bacteriana, de levadura o mamífero, muy preferible una cepa de *E. coli* adecuada como, por ejemplo, JM83 para expresión periplásmica o BL21 para expresión en cuerpos de inclusión. El polipéptido se puede cosechar del periplasma o formar cuerpos de inclusión y purificados usando técnicas estándar tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de fase invertida, cromatografía de afinidad y/o filtración de gel conocidas al experto en la técnica.

Los anticuerpos de la invención se pueden caracterizar con respecto al rendimiento, solubilidad y estabilidad *in vitro*. Por ejemplo, capacidades de unión hacia TNF, preferiblemente hacia TNF α humano, se pueden probar *in vitro* por ELISA o resonancia de plasmón superficial (BIACore), usando TNF humano recombinante como se describe en WO9729131, el último método también permitiendo determinar el constante de velocidad k_{off} , que debería ser preferiblemente de menos de $10^{-3}s^{-1}$. Se prefieren valores K_d de ≤ 10 nM.

En una modalidad, la presente invención provee anticuerpos que unen $\text{TNF}\alpha$ y de esta manera son adecuados para bloquear la función de $\text{TNF}\alpha$ *in vivo*. En una modalidad particular, el anticuerpo anti- $\text{TNF}\alpha$ comprende la secuencia SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 17.

5 Para aplicaciones terapéuticas, anticuerpos anti-TNF de la invención son administrados a un mamífero, preferiblemente un humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tales como aquellas discutidas antes, incluyendo aquellas que se pueden administrar a un humano intravenosamente como una
10 inyección intravenosa rápida o por infusión continua sobre un periodo de tiempo, por ruta intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, intraocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica o inhalación, por ejemplo. Los anticuerpos también son
15 administrados de manera adecuada por rutas intratumorales, peritumorales, intralesionales o perilesionales, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

 Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser
20 tratada, como se definió antes, la severidad y curso de la enfermedad, ya sea el anticuerpo administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico. El anticuerpo es administrado de manera adecuada al paciente una sola
25 vez o sobre una serie de tratamientos.

Anticuerpos anti-TNF de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas con TNF. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria o semanal típica puede variar de alrededor de 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados antes. Para administraciones repetidas sobre varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento es repetido hasta que ocurra una supresión deseada de síntomas de enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitorea con facilidad por técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, escaneo de tumor radiográfica.

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la efectividad del anticuerpo para prevenir o tratar una enfermedad se puede mejorar al administrar el anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que sea efectivo para aquellos propósitos, tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica de factor de crecimiento de fibroblasto ácido o básico (FGF) o factor de crecimiento de hepatocito (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes de factor de tejido, proteína

C o proteína S (ver Esmon y otros, publicación de patente de PCT No. WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unir a receptor HER2 (ver Hudziak y otros, publicación de patente de PCT No. WO 89/06692, publicada el 27 de julio de 1989),
5 o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas de ácido fólico, anti-metabolitos de metabolismo de ácido nucleico, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracil, cisplatina, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol, o corticoesteroides.
10 Dichos otros agentes pueden estar presentes en la composición siendo administrada o se pueden administrar por separado. También, el anticuerpo se administra de manera adecuada en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, ya sea involucrando irradiación o administración de sustancias radioactivas.
15 Se pueden usar anticuerpos de la invención como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado hace contacto con una muestra que contiene una
20 proteína diana (o fragmento de la misma) que el anticuerpo une, tal como TNF en el caso de anticuerpos anti-TNF α , a purificarse, y después el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína diana, que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte

se lava con otro solvente adecuado, tal como regulador de glicina, pH 5.0, que liberará la proteína diana del anticuerpo.

También pueden ser útiles anticuerpos en ensayos diagnósticos para una proteína diana, por ejemplo, detectando su expresión en
5 células específicas, tejidos o suero. Dichos métodos diagnósticos pueden ser útiles en diagnóstico de cáncer.

Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo típicamente será marcado con una porción detectable. Numerosas etiquetas están disponibles que por lo general se agrupan en las siguientes
10 categorías:

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

(b) Etiquetas fluorescentes tales como quelatos de tierra rara (quelatos de europio) o fluoresceína o sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red están
20 disponibles. Las etiquetas fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. Se puede cuantificar la fluorescencia usando un fluorímetro.

(c) Varias etiquetas de sustrato de enzima están disponibles
25 y la patente de E.U.A. No. 4,275,149 provee una revisión de algunas

de éstas. La enzima por lo general cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir usando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. De manera

5 alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se describieron antes técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y entonces puede emitir luz que se puede medir (usando un

10 quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de E.U.A. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, deshidrogenasa de malato, ureasa,

15 peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido (por ejemplo, oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa y deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y oxidasa de xantina), lactoperoxidasa,

20 microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan y otros, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981). Ejemplos

25 de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

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

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

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

10

Numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato están disponibles a aquellos expertos en la técnica. Para una revisión general de estos, ver las patentes de E.U.A. Nos. 4,275,149 y 4,318,980. A veces, la etiqueta se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto estará consciente de varias técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de etiquetas mencionadas antes se pueden conjugar con avidina, o viceversa. Biotina une selectivamente a avidina y de esta manera, la etiqueta se puede conjugar con el anticuerpo en esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los tipos diferentes de etiquetas mencionados antes se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por

15

20

ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De esta manera, se puede lograr conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

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

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

Los ensayos de unión competitivos dependen de la habilidad de un estándar marcado para competir con el analito de muestra de prueba para unir con una cantidad limitada de anticuerpos. Por ejemplo, la cantidad de proteína de TNF en la muestra de prueba a la
15 inversa es proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que se une, los anticuerpos por lo general son insolubilizados antes o después de la competencia, de modo que el estándar y analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar
20 de manera conveniente del estándar y analito que permanecen no unidos.

Los ensayos de emparedado involucran el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectarse. En un ensayo de
25 emparedado, el analito de muestra de prueba se une por un primer

anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, de esta manera formando un complejo de tres partes insoluble. Ver, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,376,110. El segundo anticuerpo se puede marcar por sí mismos usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con una porción detectable (ensayo de emparedado indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de emparedado es un ensayo ELISA, en cuyo caso la porción detectable es una enzima.

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

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

Un anticuerpo de la presente invención se puede proveer en un equipo, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo diagnóstico. En donde el anticuerpo se marca con una enzima, el equipo incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que provee el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, otros aditivos se pueden incluir tales como estabilizadores, reguladores (por ejemplo, un regulador de

bloque o regulador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los varios reactivos se puede variar ampliamente para proveer para concentraciones en solución de los reactivos que sustancialmente optimizan la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se
5 pueden proveer como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proveerán una solución de reactivo teniendo la concentración apropiada.

La invención provee además formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención para propósitos
10 terapéuticos. En una modalidad, la invención provee anticuerpos anti-TNF para el tratamiento de enfermedades mediadas con TNF.

El término “formulación farmacéutica” se refiere a preparaciones que están en tal forma para así permitir la actividad biológica del anticuerpo para ser inequívocamente efectiva, y que
15 contienen ningún componente adicional que sean tóxicos a los sujetos a los cuales se administraría la formulación. Los excipientes “farmacéuticamente aceptables” (vehículos, aditivos) son aquellos que razonablemente se pueden administrar a un sujeto mamífero para proveer una dosis efectiva del ingrediente activo empleado.

20 Una formulación “estable” es una en donde el anticuerpo ahí retiene en esencia su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica al almacenar. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteína están disponibles en la técnica y son revisadas en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent
25 Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y

Jones, A., *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. Se puede medir la estabilidad a una temperatura seleccionada por un periodo de tiempo seleccionado. Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año por al menos 2 años. Además, la formulación es preferiblemente estable después de congelar (a, por ejemplo, -70°C) y descongelar la formulación.

Un anticuerpo “retiene su estabilidad física” en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalación sobre examinación visual de color y/o claridad, o como se mide por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión de tamaño.

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

que se puede evaluar por cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo.

Un anticuerpo “retiene su actividad biológica” en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en
5 un momento dado está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida al momento que se preparó la formulación como se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. Otros ensayos de “actividad biológica” para anticuerpos se elaboran en la presente más adelante.

10 Por “isotónico” se quiere decir que la formulación de interés tiene en esencia la misma presión osmótica como la sangre humana. Las formulaciones isotónicas en general tendrán una presión osmótica de alrededor de 250 a 350 mOsm. Se puede medir la isotonicidad usando un osmómetro de tipo presión a vapor o
15 congelación, por ejemplo.

Un “poliol” es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductoras y no reductoras), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en la presente tienen un peso molecular que es menos de aproximadamente 600 kD
20 (por ejemplo, en el rango de alrededor de 120 a aproximadamente 400 kD). Un “azúcar reductora” es una que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones de metal o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un “azúcar no reductora” es una que no tiene estas propiedades de un
25 azúcar reductora. Ejemplos de azúcares reductoras son fructosa,

manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Azúcares no reductoras incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En
5 cuanto a ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas de los mismos. En donde se desee que la formulación sea estable a congelación-descongelación, el poliol preferiblemente es uno que no se cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de modo que desestabiliza el anticuerpo en la formulación.
10 Azúcares no reductoras incluyen, pero no se limitan a, sacarosa y trehalosa.

Como se usa en la presente, “regulador” se refiere a una solución regulada que resiste cambios en pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. El regulador de esta
15 invención tiene un pH en el rango de alrededor de 4.5 a aproximadamente 7.0; preferiblemente de alrededor de 4.8 a aproximadamente 6.5. Ejemplos de reguladores que controlarán el pH en este rango incluye acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato
20 y otros reguladores de ácido orgánico. En donde se desee una formulación estable a congelación-descongelación, el regulador es preferiblemente no fosfato.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un anticuerpo
25 se refiere a una cantidad efectiva en la prevención o tratamiento de

un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es efectivo. Una “enfermedad/trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas
5 condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Un “conservador” es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir en esencia la acción bacteriana ahí, así facilitando la producción de una formulación de multi-uso, por
10 ejemplo. Ejemplos de conservadores potenciales incluyen cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en donde los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservadores incluyen
15 alcoholes aromáticos tales como fenol, butilo y alcohol bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservador más preferido en la presente es alcohol bencílico.

La presente invención también provee composiciones
20 farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos, junto con al menos un portador o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, reguladores (por ejemplo, solución salina regulada neutral o solución salina regulada de fosfato), etanol, aceite mineral,
25 aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa,

manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatona y/o conservadores. Como se señaló antes, otros ingredientes activos pueden (pero no
5 necesitan) ser incluidos en las composiciones farmacéuticas provistas en la presente.

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

Se pueden formular composiciones farmacéuticas para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo, por
25 ejemplo, administración ocular, intranasal, ótica, sublingual,

transdérmica, tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En ciertas modalidades, se prefieren composiciones en una forma adecuada para uso oral. Dichas formas incluyen, por ejemplo, píldoras, tabletas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, 5 polvos o gránulos que se pueden dispersar, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elíxires. Todavía dentro de otras modalidades, las composiciones provistas en la presente se pueden formular como un liofilizato. El término parenteral como se usa en la presente incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por 10 ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier inyección o técnica de infusión similar.

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención se puede administrar directamente al ojo por inyección al tejido ocular tal 15 como inyecciones perioculares, conjuntivales, “subtenon”, intracamerales, intravitreales, intraoculares, subretinales, subconjuntivales, retrobulbares o intracanaliculares; por aplicación directa al ojo usando un catéter u otro dispositivo de colocación tal como una bola pequeña retinal, inserto intraocular, supositorio o un 20 implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso por gotas oculares tópicas o ungüentos; o por un dispositivo de liberación lenta en el cul-de-sac o implantado adyacente a la esclera (tranesccleral) o en la esclera (intraescleral) o dentro del ojo. La inyección intracameral puede ser a través de la córnea en la cámara 25 anterior para permitir al agente alcanzar la malla trabecular. La

inyección intracanalicular puede estar en los canales colectores venosos drenando canal de Schlemm o en el canal de Schlemm.

Para administración oftálmica, un anticuerpo de la invención se puede combinar con conservadores oftalmológicamente aceptables, so-solventes, agentes tensioactivos, potenciadores de viscosidad, 5 potenciadores de penetración, reguladores, cloruro de sodio, o agua para formar una suspensión o solución acuosa, estéril u oftálmica. Se pueden empacar productos oftálmicos tópicos, por ejemplo, en forma de multidosis. De esta manera, se pueden requerir 10 conservadores para prevenir contaminación microbiana durante el uso. Los conservadores adecuados incluyen: clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico, poliquaternio-1, u otros agentes conocidos a aquellos conocidos en la técnica. Dichos conservadores típicamente se 15 emplean a un nivel de 0.001 a 1.0% p/v. Las composiciones de dosis unitaria de la presente invención serán estériles, pero típicamente no conservadas. Por lo tanto, dichas composiciones por lo general no contendrán conservadores.

En ciertas modalidades, las composiciones destinadas para 20 administrarse tópicamente al ojo se formulan como gotas para ojos o ungüentos para ojos, en donde la cantidad total de anticuerpo será de alrededor de 0.001 a 1.0% (p/p). Preferiblemente, la cantidad de anticuerpo TNF α es de alrededor de 0.01 a aproximadamente 1.0% (p/p).

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

10 Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de conformidad con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno o más agentes, tales como agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agente colorante, y agentes conservadores a
15 fin de proveer preparaciones atractivas y apetecibles. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio,
20 lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio), agentes granulantes y desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico), agentes de unión (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco). Las tabletas pueden ser no revestidas o se pueden revestir
25 por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción

en el tracto gastrointestinal y por tanto proveen una acción sostenida sobre un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato e glicerilo.

5 También se pueden presentar formulaciones para uso oral como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite
10 (por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva). Las suspensiones acuosas contienen el anticuerpo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa,
15 hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia); y agentes de dispersión y humectantes (por ejemplo, fosfatidas que ocurren de manera natural tal como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos tal como estearato de polioxietileno,
20 productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga tal como heptadecaetileno-oxietanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de
25 etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y

anhídridos de hexitol tal como monooleato de sorbitán de polietileno). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservadores, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes
5 saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Se pueden formular jarabes o elíxires con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden comprender uno o más emolientes, conservadores, agentes saborizantes y/o agentes
10 colorantes.

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

Polvos y gránulos que se pueden dispersar adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por la adición de agua proveen el ingrediente activo en mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservadores. Los
25 agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de

suspensión son ejemplificados por aquellos ya mencionados antes. Excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes, también pueden estar presentes.

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

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como una
suspensión acuosa o empalagosa inyectable estéril en donde el
modulador, dependiendo del vehículo y concentración usados, se
20 suspende o disuelve en el vehículo. Dicha composición se puede
formular de conformidad con la técnica conocida usando agentes
dispersantes, humectantes y/o de suspensión adecuados tales como
aquellos mencionados antes. Entre los vehículos y solventes
aceptables que se pueden emplear son agua, 1,3-butanodiol,
25 solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además,

se pueden emplear aceites fijos estériles como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tal como ácido oleico en la
5 preparación de composiciones inyectables, y adyuvantes tales como anestésicos locales, conservadores y/o agentes reguladores se pueden disolver en el vehículo.

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

Los anticuerpos anti-TNF α provistos en la presente se pueden administrar en una cantidad que logra una concentración en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, CSF, fluido sinovial,
25 linfa, fluido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente

para unir de manera detectable a TNF y prevenir o inhibir enfermedades/trastornos mediados con TNF. Una dosis es considerada como efectiva si resulta en un beneficio discernible al paciente como se describe en la presente. Las dosis sistémicas
5 preferidas varían de alrededor de 0.1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día (de alrededor de 0.5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día), con dosis orales por lo general siendo de aproximadamente 5-20 veces más que las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo que se puede combinar con
10 los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular. Las formas unitarias de dosificación en general contendrán entre alrededor de 1 mg a aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.

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

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden
25 modificar químicamente. Los grupos modificadores preferidos son

polímeros, por ejemplo, un polímero de polialqueno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado. Dicho grupo efector puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*.

5 Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), alcohol polivinílico) de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o derivados de los mismos. Los polímeros particulares que ocurren de manera natural incluyen lactosa, amilosa, dextrán, glicógeno o derivados de

10 los mismos. El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero en general estará en un rango de peso molecular promedio de 500Da a 50000Da. Para aplicación local en donde el cuerpo está diseñado para penetrar tejido, un peso molecular preferido del polímero es alrededor de 5000Da. La molécula de polímero se puede

15 fijar al anticuerpo, por ejemplo, al extremo de terminal C de una cadena pesada de fragmento Fab vía un péptido de gozne covalentemente enlazado como se describe en WO0194585. Con respecto a la fijación de porciones de PEG, se hace referencia a

20 "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Después de la preparación del anticuerpo de interés como se describió antes, se prepara la formulación farmacéutica que lo

25 comprende. El anticuerpo a formularse no se ha sometido a

liofilización previa y la formulación de interés en la presente es una formulación acuosa. Preferiblemente, el anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv. La cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo presente en la formulación se determina al considerar los volúmenes y modo(s) de administración de dosis deseada, por ejemplo. De alrededor de 0.1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferiblemente de alrededor de 0.5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml y muy preferible de alrededor de 2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml es una concentración de anticuerpo ejemplar en la formulación.

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

Un poliol, que actúa como un tonificante y puede estabilizar al anticuerpo, se incluye en la formulación. En modalidades preferidas, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro de sodio, ya que esto puede causar que el anticuerpo se precipite y/o puede resultar en oxidación a pH bajo. En modalidades preferidas, el poliol es un azúcar no reductora, tal como sacarosa o trehalosa. El poliol se agrega a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferiblemente, la formulación acuosa es isotónica,

en cuyo caso concentraciones adecuadas del poliol en la formulación están en el rango de alrededor de 1% a aproximadamente 15% p/v, preferiblemente en el rango de alrededor de 2% a aproximadamente 10% p/v, por ejemplo. Sin embargo, también pueden ser adecuadas las formulaciones hipertónicas o hipotónicas. La cantidad de poliol
5 agregado también puede alterarse con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, se puede agregar una cantidad menor de monosacárido (por ejemplo, manitol), en comparación con un disacárido (tal como trehalosa).

10 También se puede agregar un agente tensioactivo a la formulación de anticuerpo. Agentes tensioactivos ejemplares incluyen agentes tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). Típicamente, la cantidad de agente tensioactivo
15 agregado es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado/derivado de anticuerpo y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el agente tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0.001% a aproximadamente 0.5%,
20 preferiblemente de alrededor de 0.005% a aproximadamente 0.2% y muy preferible de alrededor de 0.01% a aproximadamente 0.1%.

En una modalidad, una formulación contiene los agentes identificados antes (es decir, anticuerpo, regulador, poliol y agente tensioactivo) y en esencia está libre de uno o más conservadores,
25 tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de

bencetonio. En otra modalidad, se puede incluir un conservador en la formulación, en particular en donde la formulación es una formulación de multidosis. La concentración de conservador puede estar en el rango de alrededor de 0.1% a aproximadamente 2%, muy
5 preferible de alrededor de 0.5% a aproximadamente 1%. Uno o más portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como aquellos descritos en *Pharmaceutical Sciences* de Remington, 21^a edición, Osol, A. Ed. (2006) se pueden incluir en la formulación siempre y cuando no afectan de manera
10 adversa las características deseadas de la formulación. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a excipientes en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes reguladores adicionales; co-solventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tal como
15 EDTA; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína de Zn); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tal como sodio.

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

La formulación es administrada a un mamífero en necesidad de tratamiento con el anticuerpo, preferiblemente un humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración
25 intravenosa como una bola o por infusión continua sobre un periodo

de tiempo, por rutas intramusculares, intraperitoneales, intracerebroespinales, subcutáneas, intra-articulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o inhalación, u otras rutas como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la formulación es
5 administrada al mamífero por administración intravenosa. Para dicho propósito, la formulación se puede inyectar usando una jeringa o vía una línea IV, por ejemplo.

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

Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo administrado estará en el rango de alrededor
20 de 0.1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea por una o más administraciones, con el rango típico de anticuerpo usado siendo de alrededor de 0.3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferible de alrededor de 0.3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden

ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitorea con facilidad por técnicas convencionales.

En ciertas modalidades, composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-TNF α de la invención se administran
5 a un paciente que sufre de un trastorno mediado con TNF.

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

Los contenidos de cualquier patente, solicitud de patente y referencias citadas a lo largo de la especificación por tanto se incorporan a la presente por referencia en sus totalidades.

A menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos únicos usados en la presente deberán incluir pluralidades y los términos en plural deberán incluir el singular.

5

EJEMPLOS

La presente descripción se ilustra más por los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser considerados como limitantes. Los contenidos de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente a la presente por referencia en sus totalidades.

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

15

Materiales y métodos generales

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (en especial, por ejemplo, tecnología de anticuerpo), y técnicas estándar de preparación de polipéptido. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Clonación Molecular: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Antibody Engineering Protocols* (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996);

Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y otros, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons (1992).

Mediciones de termoestabilidad

Se obtuvieron espectros de transformación IR de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) para varias cadenas individuales y moléculas de seguimiento usando la célula FT-IR Bio-ATR en un Tensor Bruker. Las moléculas se concentraron hasta 3 mg/ml y se dializaron durante la noche a 4°C contra PBS, pH 6.5 y el flujo regulador fue recolectado como en blanco. Los perfiles de desnaturalación fueron obtenidos al termo retar las moléculas con un rango amplio de temperaturas en pasos de 5°C (25 a 95°C). Se realizaron todas las manipulaciones de espectro usando software OPUS. El regulador principal y antecedente atmosférico transitorio (CO₂ y H₂O) se sustrajeron del espectro de proteína. El espectro de proteína resultante entonces se corrigió de línea base y se determinó el espectro de proteína amida I a partir del ancho del pico más amplio en la región esperada. Se obtuvieron segundos espectros derivados del espectro de banda de amida I usando una tercera función polinomial de tercer grado con una función suavizante. Se estimaron cambios en estructura de proteína por análisis derivado

segundo de amida I usando una curva de calibración lineal para los cálculos de curva iniciales suponiendo 0% de desnaturación para las 3 mediciones menores y 100% de desnaturación para las 3 mediciones mayores. Se usaron los perfiles de desnaturación a 5 puntos medios aproximados de las transiciones de desdoblado térmicas (TM) para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Mediciones de solubilidad

10

La solubilidad relativa a varias moléculas scFv se midió después de la agregación de proteína potenciadora y precipitación en presencia de sulfato de amonio. Se agregó sulfato de amonio a la proteína en soluciones acuosas para dar incrementos de 5% de 15 saturación en la mezcla final de sal-proteína. La precipitación en el rango dinámico se determinó empíricamente y los intervalos de saturación reducidos en este rango a 2.5% de saturación de intervalos en la mezcla final. Después de adición de sulfato de amonio, las muestras se mezclaron con cuidado y se centrifugaron 30 20 minutos a 6000rpm. La proteína restante en sobrenadantes se recuperó para cada porcentaje de sulfato de amonio de saturación. Se determinaron curvas de solubilidad al medir la concentración de proteína en el sobrenadante usando NanoDrop™ 1000 espectrofotómetro. Se normalizaron las mediciones de proteína 25 soluble restante en sobrenadantes y se usaron para estimar puntos

medios de solubilidad relativa para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Prueba de estabilidad a plazo corto

5

Se examinó la proteína después de dos semanas de incubación a 40°C para agregados solubles y productos de degradación. Las proteínas con una concentración de 10 mg/ml se dializaron durante la noche a 4°C contra PBS con un rango amplio de pHs (3.5, 4.5, 5.5, 10 6.5, 7.0, 7.5 y 8.5). La proteína de control con la misma concentración en PBS regulador estándar (pH 6.5) se almacenó a -80°C durante el periodo de 2 semanas. La determinación de bandas de degradación por SDS-PAGE se hizo a t=0 y t=14d puntos de tiempo y los agregados solubles fueron evaluados en la SEC-HPLC. 15 La determinación de actividad restante después de 2 semanas a 40°C se hizo usando Biacore.

EJEMPLO 1

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

El anticuerpo 34rFW1.4 muestra una propensión para agregación dependiente de pH en solución. El anticuerpo 578rFW1.4 25 (ver solicitud internacional WO2009155724), que comparte la misma

estructura como 34rFW1.4, no muestra una propensión por agregación. Se generaron modelos de homología para identificar residuos potenciales en el 34rFW1.4 que se podrían modificar para reducir su propensión de agregación de la siguiente manera.

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

El programa MODELER del software Discovery Studio versión 2.5.5 (DS 2.5.5) (Accelrys, Inc., San Diego, CA) se usó para generar modelos 100 scFv con base en las plantillas de dominio variable identificado. La alineación de las secuencias de anticuerpo de
20 referencia a modelarse con estructuras de plantilla se usaron como datos de entrada. Se prepararon 100 modelos que contienen todos los átomos de no hidrógeno. Se seleccionaron las mejores estructuras de modelo con base en una calificación de energía física de PDF (función de densidad de probabilidad). La orientación relativa
25 de dominio VH y VL se ajustó para igualar aquella de la estructura de

plantilla de dominio variable con la homología más alta a ambas secuencias modeladas (VL y VH). Se eliminaron conformaciones alternas en el modelo, se agregaron terminales, y se agregaron átomos de cadena lateral faltantes. Se aplicó campo de fuerza CHARMM a los modelos scFv y se sometieron a 2000 ciclos de minimización de energía usando un gradiente RMS de 0.01 y el “born” generalizado con volumen molecular (GBMV) como modelo de solvente implícito.

Se realizaron cálculos de ionización de proteína y residuo pK para cada uno de los anticuerpos. Se hicieron los cálculos usando la implementación de protocolo incluido en Discovery Studio versión 2.5.5 (DS 2.5.5), con base en la teoría desarrollada por Bashford y Karplus, 1991. Los resultados de ionización de proteína y cálculos de residuo pK se compararon para las dos moléculas en términos de $pK_{1/2}$ de las cadenas laterales y curvas de titulación de cada residuo titulable, incluyendo Asp, Glu, Arg, Lys, His, Tyr, Cys, los residuos de terminal N y terminal C de los anticuerpos.

Se aplicó campo de fuerza CHARMM a los modelos scFv y se protonaron a pH 7.4, curvas de titulación y pKs de los residuos individuales se calcularon a partir del rango de pH 2 a pH 14 usando los pasos de pH de 0.2. Dos residuos de Lys conservados en las posiciones 47 y 50 en la cadena ligera del anticuerpo 578rFW1.4 difirieron en comparación con el Lys en aquellas posiciones en el 34rFW1.4 (ver figura 1).

Introducción de sustituciones preferidas

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

Se seleccionó arginina (R) como una sustitución de residuo posible para la lisina (K) en las posiciones 47 y 50, ya que el valor de pKa de cadena lateral para R (12.5) es mayor que pKa de K (10.5). Se generaron mutantes K47R y K50R al reemplazar K por R individualmente en las posiciones respectivas. 2000 ciclos de

minimización de energía se realizaron para residuos 10 Angstroms o más cercano al área alrededor de la mutación para permitir a las nuevas moléculas de modelo adaptarse al cambio. El modelo de solvente implícito para estas rondas de minimización de energía fue GBMV. G delta promedio predicho para los mutantes fue -94 kcal/mol. Por lo tanto, la contribución de las mutaciones fue estimada a 4 kcal/mol en comparación con el anticuerpo scFv anti-TNF parental.

10

EJEMPLO 2

Análisis de estabilidad del anticuerpo 34rFW1.4 optimizado

Se generaron el mutante K50R y mutante K47R en el anticuerpo 34rFW1.4 (que se describe en la solicitud internacional co-pendiente No. PCT/CH2009/000219, presentada el 25 de junio de 2009, los contenidos de la cual se incorporan a la presente por referencia en su totalidad). Otro mutante de 34rFW1.4 teniendo sustituciones adicionales para reducir su inmunogenicidad *in vivo* se preparó de conformidad con los métodos descritos en la solicitud de patente de E.U.A. No. 12/973,968. En particular, el tercer mutante, designado 34rFW1.4_VLK50R_DHP, contuvo una serina (S) en la posición 12 de cadena pesada (numeración AHo), una treonina (T) en la posición 103 de cadena pesada (numeración AHo), y una treonina (T) en la posición 144 de cadena pesada (numeración AHo). Estudios de

estabilidad de los anticuerpos 34rFW1.4 origen y mutantes se realizaron bajo condiciones aceleradas de la siguiente manera.

El anticuerpo 34rFW1.4, mutante 34rFW1.4_VL_K50R, y 34rFW1.4_VLK50R_DHP se concentraron hasta 20, 40 y 60 mg/mL en
5 solución salina regulada con fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6.5) formulación e incubada 2 semanas a 40°C. Los anticuerpos 34rFW1.4 y 34rFW1.4_K47R se concentraron hasta 20 y 60 mg/mL en solución salina regulada con fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6.5) formulación e incubada 2 semanas a 40°C. Se
10 analizaron muestras antes y después de 14 días de incubación para degradación usando 12.5% de electroforesis de gel de dodecilsulfato – poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras. Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño (SE-HPLC) para determinar el contenido de
15 monómero y agregados solubles de las muestras antes y después del periodo de incubación. Los monómeros fueron resueltos de especies no monoméricas en una columna TSKgel Super SW2000 (TOSOH Bioscience) y el porcentaje de proteína monomérica se calculó como el área del pico de monómero dividido por el área total de todos los
20 picos de producto. Los resultados de los estudios para 34rFW1.4 y 34rFW1.4_VLK50R_DHP se muestran en las figuras 2A-B, 3A-B y 4A-B, respectivamente. Los resultados para 34rFW1.4_VL_K50R se muestran en las figuras 5B, 6B y 7B. Estos experimentos demostraron que 34rFW1.4_VLK50R_DHP tuvo una propensión
25 reducida para agregación en comparación con 34rFW1.4. El mutante

34rFW1.4_K47R también demostró dicha reducción como se muestra en las figuras 8B y 9B.

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

EQUIVALENTES

10

Numerosas modificaciones y modalidades alternativas de la presente invención serán evidentes a aquellos expertos en la técnica en vista de la descripción anterior. Por consiguiente, esta descripción debe ser considerada solamente como ilustrativa y es
15 para el propósito de enseñanza para aquellos expertos en la técnica el mejor modo para llevar a cabo la presente invención. Detalles de la estructura pueden variar sustancialmente sin alejarse del espíritu de la invención, y se reserva el uso exclusivo de todas las modificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones
20 anexas. Se pretende que la presente invención sea limitada sólo al grado requerido por las reivindicaciones anexas y las reglas de derecho aplicables.

Toda la literatura y material similar citados en esta solicitud, incluyendo, patentes, solicitudes de patente, artículos, libros,
25 tratados, disertaciones, páginas web, figuras y/o apéndices, sin

importar el formato de dicha literatura y materiales similares, se incorporan expresamente a la presente por referencia en su totalidad. En el caso de que uno o más de la literatura incorporada y materiales similares difieran de o contradigan esta solicitud, 5 incluyendo términos definidos, uso de términos, técnicas descritas, o similares, esta aplicación controla.

Los encabezados de cada sección usados en la presente son sólo para propósitos de organización y no deben ser considerados como limitantes a la materia sujeto descrita en cualquier manera.

10 Aunque las presentes invenciones han sido descritas en conjunto con varias modalidades y ejemplos, no se pretende que las presentes enseñanzas sean limitadas a dichas modalidades o ejemplos. Por el contrario, las presentes invenciones abarcan varias alternativas, modificaciones y equivalentes, como serán apreciadas 15 por aquellos expertos en la técnica.

Las reivindicaciones no deben ser leídas como limitadas al orden descrito o elementos a menos que se mencione a ese efecto. Cabe señalar que varios cambios en forma y detalle se pueden hacer sin alejarse del alcance de las reivindicaciones anexas. Por lo tanto, 20 se reclaman todas las modalidades que se encuentran dentro del alcance y espíritu de las siguientes reivindicaciones y equivalentes de los mismos.

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo que se une específicamente a TNF α humano, que comprende:

- 5 a. una cadena ligera variable que comprende la secuencia de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 14; y
- b. una cadena pesada variable que comprende la secuencia de SEC ID NO: 5.

2.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en
10 donde la cadena ligera variable comprende la secuencia de SEC ID NO: 2.

3.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la cadena ligera variable comprende la secuencia de SEC ID NO: 14.

15 4.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, que tiene además un enlazador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 7.

5.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende la secuencia de SEC ID NO: 10.

20 6.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende la secuencia de SEC ID NO: 17.

7.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

8.- Un método de tratar una enfermedad mediada con $\text{TNF}\alpha$ que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde
5 la enfermedad mediada con $\text{TNF}\alpha$ es un trastorno ocular seleccionado a partir del grupo que consiste de uveítis, enfermedad de Bechet, retinitis, ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjörgen, neuropatía diabética, escleritis, degeneración macular relacionada con la edad y queratitis.

10 10.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica es administrada por administración ocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica, tópica, oral, nasal, rectal o parenteral.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 10, en
15 donde la composición farmacéutica se administra en una dosis individual o dividida que comprende 0.1 a 100 mg del anticuerpo.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde la enfermedad mediada con $\text{TNF}\alpha$ es uveítis, y la composición farmacéutica se administra tópicamente a un ojo del sujeto.

20 13.- Una molécula de ácido nucleico aislada codificando el anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1.

14.- Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 13.

25 15.- Una célula huésped que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 14.

16.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', un F(ab)'₂, Fv(scFv) de una cadena, un Fv, o un anticuerpo lineal.

17.- Una molécula bivalente o biespecífica que comprende el
5 anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1.

18.- Un método para reducir la propensión para agregación de un anticuerpo, el método que comprende introducir una o más sustituciones de aminoácido en la interface de una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) del anticuerpo, en
10 donde las una o más sustituciones están en posiciones de residuo seleccionadas para reducir la energía libre entre la VL y VH por al menos 0.5 kcal/mol, así reduciendo la propensión de agregación del anticuerpo en comparación con un anticuerpo parental.

19.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en
15 donde el anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', un F(ab)'₂, Fv(scFv) de una cadena, un Fv, un diacuerpo, un diacuerpo de una cadena, un anticuerpo tándem o un anticuerpo lineal.

20.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde la secuencia de la cadena ligera variable del anticuerpo tiene
20 por lo menos 65% de identidad a la secuencia de SEC ID NO: 1.

21.- El método de conformidad con la reivindicación 20, en donde la modificación comprende una sustitución en la posición 50 AHo y/o posición 47 AHo de la cadena ligera variable.

22.- El método de conformidad con la reivindicación 21, en donde la sustitución es una arginina (R) en la posición 50 AHo y/o una arginina (R) en la posición 47 AHo de la cadena ligera variable.

23.- El método de conformidad con la reivindicación 22, en donde lisina (K) se sustituye por arginina (R) en la posición 47 AHo y/o 50 de la cadena ligera variable.

24.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de cadena pesada variable que tiene por lo menos 85% de identidad a la secuencia de SEC ID NO: 1.

25.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de cadena pesada variable que tiene por lo menos 85% de identidad a la secuencia de SEC ID NO: 3 o la secuencia de SEC ID NO: 4.

26.- El método de conformidad con la reivindicación 18, que comprende además sustituciones de aminoácido en posición 12, 103 y 144 AHo de la cadena pesada variable.

27.- Un anticuerpo producido por el método de conformidad con la reivindicación 18.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La descripción provee anticuerpos que se modifican para reducir propensión de agregación, y los métodos de producir dichos anticuerpos. La presente descripción también provee en particular anticuerpos scFv estables y solubles y fragmentos Fab específicos para TNF, que comprenden secuencias específicas de cadena ligera y cadena pesada que se optimizan para estabilidad, solubilidad, unión in vitro o in vivo de TNF, e inmunogenicidad baja. También se describen ácidos nucleicos, vectores y células huésped para expresión de los anticuerpos recombinantes de la descripción, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en la medicina.

15

20

25

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GRÜNECKER KINKELDEY STOCKMAIR &
SCHWANHÄUSSER
Leopoldstr. 4
80802 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 28 March 2013 (28.03.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PCT80094FZ210	
International application No. PCT/CH2011/000256	International filing date (day/month/year) 24 October 2011 (24.10.2011)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative										
Name and Address ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address									
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence										
Name and Address ESBATECH, A NOVARTIS COMPANY LLC Wagistrasse 21 CH-8952 Schlieren Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized									
3. Further observations, if necessary:										
4. A copy of this notification has been sent to: <table border="0"><tr><td>☐ the receiving Office</td><td>☐ the International Preliminary Examining Authority</td></tr><tr><td>☐ the International Searching Authority</td><td>☒ the designated Offices concerned</td></tr><tr><td>☐ the Authority(ies) specified for supplementary search</td><td>☐ the elected Offices concerned</td></tr><tr><td></td><td>☐ other:</td></tr></table>			☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned		☐ other:
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority									
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned									
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned									
	☐ other:									

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Neuling Harriet e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 75

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/CH2011/000256

International filing date (day/month/year)
24.10.2011

Priority date (day/month/year)
22.10.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/24

Applicant
ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC

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

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

2. **FURTHER ACTION**

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Nooij, Frans

Telephone No. +31 70 340-3267



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/CH2011/000256

Box No. I Basis of the opinion

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

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	<u>18-27</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-27</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-27</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/CH2011/000256

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Present claims **8-12** relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Reference is made to the following documents:

- D1* WO 2009/155723 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 30 December 2009 (2009-12-30)
- D2* B. BAYNES ET AL.: "Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation.",
BIOCHEMISTRY,
vol. 44, no. 12, 29 March 2005 (2005-03-29), pages 4919-4925,
U.S.A.
- D3* F. KRISTOFFER ET AL.: "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution.",
JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY,
vol. 376, no. 4, 29 February 2008 (2008-02-29), pages 926-931,
England
- D4* WO 2009/000099 A2 (ESBATECH AG) 31 December 2008 (2008-12-31)
- D5* WO 2010/003268 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 14 January 2010 (2010-01-14)

- D6* L. BORRAS ET AL.: "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 12, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 9054-9066, Baltimore, U.S.A.
- D7* S. EWERT ET AL.: "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering.", METHODS, vol. 34, no. 2, October 2004 (2004-10), pages 184-199, XP004526805, San Diego, U.S.A.
- D8* A. HONEGGER ET AL.: "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modeling and analysis tool.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893, U.K.
cited in the application
- D9* A. WÖRN ET AL.: "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 305, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 989-1010, XP004465987, U.K.

1. NOVELTY (Article 33(2) PCT)

- 1.1 *D1* discloses humanized rabbit anti-TNF scFv EP34max and EP43max and their amino acid sequences. Also stabilizing mutation K47R (AHo numbering) in VL suggested (*see example 4; table 3; claims 4, 32, 33, 37 and 42; SEQ ID NOs 78-80, 89, 90, 114 and 115*).
- 1.2 *D2* discloses the beneficial role of arginine in the stabilization against aggregation of proteins, e.g. antibodies. (*see the abstract*).

- 1.3 *D3* discloses that arginine at Kabat-residue 28 of a human dAb DP47d contributes to resistance to acid aggregation.(*see the abstract; page 929, R-col., par. 2*).
- 1.4 *D4* discloses mAbs with improved functional properties, e.g. aggregation, stability or solubility. Arginine at AHo-positions 47 and/or 50 of the Vk1 domain have been suggested.(*see page 47, l25; page 48, line 14; page 56, lines 12-17; table 16; claims 4, 13, 17 and 26*).
- 1.5 *D5* discloses humanized rabbit anti-TNF-alpha scFv EP34max and EP43max and their amino acid sequences. Nothing about stabilizing mutations in AHo VL positions 47 and/or 50 (*see claims 6-9; SEQ ID NOs 2, 7, 12, 21, 23 and 26*).
- 1.6 *D6* discloses the generation of high-affinity stable (w.r.t. temperature, nothing about aggregation) humanized scFv fragments from rabbit mAbs, e.g. mAb 34 against TNF-alpha. Human scaffold is FW1.4gen. No mutations in AHo residues 47 and 50 to improve aggregation.(*see the abstract*).
- 1.7 *D7* discloses stability improvements of antibodies: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. (*see the whole doc.*).
- 1.8 *D8* discloses AHo, a new numbering scheme for immunoglobulin variable domains. Comparison with Kabat, Chothia and IMGT.(*see the whole doc.*).
- 1.9 *D9* discloses stability engineering of antibody scFv fragments.(*see the whole doc.*).
- 1.10 In view of *D1*, the subject-matter of present claims **18-27** is considered not novel and hence said claims do not meet the requirements of Article 33(2) PCT. The present application does not disclose an anti-TNFalpha antibody

comprising a VL with sequence id 2 or 14 and a VH with sequence id 5. As a consequence, the subject-matter of present claims **1-17** is considered novel and hence said claims meet the requirements of Article 33(2) PCT.

2 INVENTIVE STEP (Article 33(3) PCT)

- 2.1 *D1* is considered to represent the most relevant state of the art and discloses humanized rabbit anti-TNF scFv EP34min and EP34max with SEQ ID NOs 114 and 115, respectively.
- 2.2 The subject-matter of present claim **1** differs from this in that lysine has been substituted with arginine at AHo positions 47 and/or 50 of the VL domain.
- 2.3 The technical effect of said difference is a reduced propensity for aggregation as compared to the wildtype framework (*see examples 1 and 2*).
- 2.4 The problem to be solved may therefore be regarded as the provision of anti-TNFalpha antibodies with improved aggregation properties.
- 2.5 Said problem has been solved by the present application, but cannot, however, be considered to involve an inventive step, for the following reasons: *D2* discloses the beneficial role of arginine in the stabilization against aggregation of proteins, e.g. antibodies. (*see the abstract*). This is corroborated by the teaching of *D3*, wherein it was shown that arginine at Kabat-residue 28 of a human dAb DP47d contributes to resistance to acid aggregation. (*see the abstract; page 929, R-col., par. 2*). Furthermore, a mutation at AHo-positions 47 and/or 50 of the VL of the rFW1.4 framework has been clearly suggested in *D1* (*see example 4; table 3*) and *D4* (*see p47, line 25; page 48, line 14; page 56, lines 12-17; table 16*) in order to improve the antibody's stability. This combined teaching would thus incite the skilled person to replace lysine by an arginine at position 47 and/or 50 in order to improve the antibody's resistance against aggregation, with a reasonable chance of success. The subject-matter of present claim **1**, as well as that from those claims (in)directly dependent on claim **1**, therefore does not involve an inventive step.

- 2.6 In conclusion, the subject-matter of present claims **1-27** is not considered to involve an inventive step and hence said claims do not meet the requirements of Article 33(3) PCT.

3 INDUSTRIAL APPLICABILITY (Article 33(4) PCT)

- 3.1 Present claims **1-27** meet the requirements of Article 33(4) PCT.

Re Item VII

Certain defects in the international application

Incorporations by reference should be deleted from the description, application numbers should be replaced by publication numbers, and sections "cross-reference to related applications" on page 1, and "equivalents" on page 60 should be deleted, and the above cited references should be introduced into the description and shortly discussed.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

4 CLARITY AND SUPPORT (Article 6 PCT)

- 4.1 Present claim **18** relates to a method which has a given desired property or effect, namely reduced free energy between the VL and VH by at least 0.5 kcal/mol. However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such method having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P107600PC00	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/CH2011/000256	International filing date (<i>day/month/year</i>) 24/10/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 22/10/2010
Applicant ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC		

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

This international search report consists of a total of 7 sheets.

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

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH2011/000256

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☒

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☒

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH2011/000256

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The disclosure provides antibodies that are modified to reduce aggregation propensity, and methods of producing such antibodies. The present disclosure also provides particularly stable and soluble scFv antibodies and Fab fragments specific for TNF, which comprise specific light chain and heavy chain sequences that are optimized for stability, solubility, in vitro and in vivo binding of TNF, and low immunogenicity. The nucleic acids, vectors and host cells for expression of the recombinant antibodies of the disclosure, methods for isolating them and the use of said antibodies in medicine are also disclosed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2011/000256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/155723 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 30 December 2009 (2009-12-30)	18-27
Y	sequences 78-80,89,90,114,115 claims 4,32,33,37,42 example 4 table 3	1-17
Y	----- B. BAYNES ET AL.: "Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation.", BIOCHEMISTRY, vol. 44, no. 12, 29 March 2005 (2005-03-29), pages 4919-4925, XP002668296, U.S.A. abstract ----- -/-	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2012

Date of mailing of the international search report

09/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, Frans

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2011/000256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	F. KRISTOFFER ET AL.: "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 376, no. 4, 29 February 2008 (2008-02-29), pages 926-931, XP002668297, England abstract page 929, right-hand column, paragraph 2 -----	1-17
Y	WO 2009/000099 A2 (ESBATECH AG) 31 December 2008 (2008-12-31) claims 4,13,17,26 page 47, line 25 page 48, line 14 page 56, line 12 - line 17 table 16 -----	1-17
A	WO 2010/003268 A2 (ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC) 14 January 2010 (2010-01-14) sequences 2,7,12,21,23,26 claims 6-9 -----	1-27
A	L. BORRAS ET AL.: "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 12, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 9054-9066, XP002668298, Baltimore, U.S.A. abstract -----	1-27
A	S. EWERT ET AL.: "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering.", METHODS, vol. 34, no. 2, October 2004 (2004-10), pages 184-199, XP004526805, San Diego, U.S.A. the whole document ----- -/--	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2011/000256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. HONEGGER ET AL.: "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modeling and analysis tool.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893, U.K. cited in the application the whole document	1-27
A	----- A. WÖRN ET AL.: "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 305, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 989-1010, XP004465987, U.K. the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CH2011/000256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009155723 A2	30-12-2009	AU 2009264564 A1 CA 2727992 A1 CN 102076716 A EP 2307457 A2 JP 2011525358 A KR 20110028516 A US 2011159007 A1 WO 2009155723 A2	30-12-2009 30-12-2009 25-05-2011 13-04-2011 22-09-2011 18-03-2011 30-06-2011 30-12-2009
WO 2009000099 A2	31-12-2008	AU 2008267734 A1 CA 2689941 A1 CN 101849001 A EP 2158315 A2 JP 2010531145 A KR 20100028575 A RU 2010102065 A US 2009074780 A1 WO 2009000099 A2	31-12-2008 31-12-2008 29-09-2010 03-03-2010 24-09-2010 12-03-2010 27-07-2011 19-03-2009 31-12-2008
WO 2010003268 A2	14-01-2010	AU 2009267729 A1 CA 2730178 A1 CN 102088958 A EP 2303230 A2 JP 2011527289 A KR 20110031373 A US 2011135644 A1 WO 2010003268 A2	14-01-2010 14-01-2010 08-06-2011 06-04-2011 27-10-2011 25-03-2011 09-06-2011 14-01-2010

CAPÍTULO REIVINDICATORIO
(Solicitud Divisional B)

1. Un anticuerpo que se une específicamente a TNF α humano, que comprende:
una cadena ligera variable que comprende la secuencia de SEC ID NO: 14; y
una cadena pesada variable que comprende la secuencia de SEC ID NO: 5.
2. El anticuerpo de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende la secuencia de SEC ID NO: 17.
3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la Reivindicación 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la Reivindicación 1 o 2.
5. Un vector que comprende el ácido nucleico de la Reivindicación 4.
6. Una célula huésped que comprende el vector de la Reivindicación 5.
