

**MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS QUE SE UNEN AL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA (TNF ALFA)**

Campo de la Invención

5 La descripción se refiere a anticuerpos específicos para TNF, a formulaciones que comprenden los mismos, al uso de cada uno en terapia, a los procesos para expresar y opcionalmente formular tal anticuerpo, al ADN que codifica los anticuerpos y a los hospederos que comprenden tal ADN.

10 **Antecedentes de la Invención**

 La superfamilia del factor de la necrosis tumoral (TNF) es una familia de proteínas que comparten una función primaria de regular la supervivencia celular y la muerte celular. Los miembros de la superfamilia de TNF comparten
15 una porción central común, que consiste en dos hojas plegadas β antiparalelas con cadenas β antiparalelas, formando una estructura β con forma de "rollo de gelatina". Otra característica común compartida por los miembros de la superfamilia de TNF es la formación de complejos homo o
20 heterotriméricos. Son estas formas triméricas de los miembros de la superfamilia de TNF las que se unen a, y activan, los receptores específicos de la superfamilia de TNF.

 TNF α es el miembro arquetípico de la superfamilia
25 de TNF - formando un homotrímero simétrico. La desregulación

de la producción de $\text{TNF}\alpha$ se ha implicado en una serie de afecciones patológicas de importancia médica significativa. Por ejemplo, $\text{TNF}\alpha$ se ha implicado en la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino (incluida la
5 enfermedad de Crohn), psoriasis, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), dolor, epilepsia, osteoporosis, asma, lupus eritematoso sistémico (SLE) y múltiples esclerosis (MS).

Los antagonistas conocidos de los miembros de la
10 superfamilia de TNF son macromoleculares y actúan inhibiendo la unión del miembro de la superfamilia de TNF a su receptor. Los ejemplos de tales antagonistas incluyen los anticuerpos anti- $\text{TNF}\alpha$, particularmente anticuerpos monoclonales, tales como infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®) y
15 certolizumab pegol (Cimzia®), o proteínas de fusión del receptor de $\text{TNF}\alpha$ soluble, tales como etanercept (Enbrel®). Ambos de estos inhiben el $\text{TNF}\alpha$ soluble y su interacción con el receptor TNFR1 (responsable de la inflamación) y el $\text{TNF}\alpha$ unido a la membrana y su interacción con el receptor TNFR2
20 (implicado en la respuesta inmune).

El papel del $\text{TNF}\alpha$ como un factor clave de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide (RA) está bien establecido. De hecho, los anticuerpos de anti- $\text{TNF}\alpha$ han transformado la atención al paciente y el anti- $\text{TNF}\alpha$ más
25 metotrexato es ahora el estándar de oro de atención actual

para los pacientes con RA.

Breve Descripción de la Invención

Por tanto, en un aspecto se proporciona un anticuerpo de anti-TNF o un fragmento de unión del mismo que
 5 comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde la región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente de la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2 y la SEC ID NO: 3, por ejemplo en donde CDR H1 es la SEC ID NO: 1, CDR
 10 H2 es la SEC ID NO: 2 y/o CDR H3 es la SEC ID NO: 3.

Así, una modalidad CDR H1 es la SEC ID NO: 1 y CDR H2 es la SEC ID NO: 2, o CDR H1 es la SEC ID NO: 1 y CDR H3 es la SEC ID NO: 3, o CDR H2 es la SEC ID NO: 2 y CDR H3 es la SEC ID NO: 3.

15 En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de unión según la presente descripción comprenden una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente de la SEC ID NO: 4 a 10, en
 20 particular en donde CDR L1 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5, CDR L2 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 y CDR L3 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 10.

Así, en una modalidad CDR L1 es la SEC ID NO: 4 y
 25 CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 o CDR L1 es la SEC ID NO:

5 y CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 o CDR L1 es la SEC ID NO: 4 o 5 y CDR L3 es la SEC ID NO: 10; o CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 o CDR L1 es la SEC ID NO: 10.

En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de
5 unión de acuerdo con la presente descripción comprenden las secuencias de CDR seleccionadas de las SEC ID NOs: 1 a 10, por ejemplo, en donde CDR H1 es la SEC ID NO: 1, CDR H2 es la SEC ID NO: 2, CDR H3 es la SEC ID NO: 3, CDR L1 es la SEC ID NO: 4 o 5, CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 y CDR L3 es la
10 SEC ID NO: 10.

También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión que se une al mismo epítipo que un anticuerpo o fragmento de unión explícitamente descrito en este documento.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo o
15 fragmento de unión que bloquea transversalmente un anticuerpo o fragmento de unión explícitamente descrito en la presente descripción para TNF humano, o es bloqueado cruzadamente para que no se una a un TNF humano por el anticuerpo.

La descripción también se extiende a un
20 polinucleótido, tal como el ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento como se describe en la presente descripción, por ejemplo, en donde el ADN se incorpora en un vector.

También se proporciona una célula hospedera que comprende el polinucleótido.

25 Los métodos para expresar un anticuerpo o fragmento

se proporcionan en la presente descripción como métodos para conjugar un anticuerpo o fragmento a un polímero, tal como PEG.

La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y fragmentos.

En una modalidad, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento o composición como se describe en este documento.

La presente descripción también se extiende a un anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la presente descripción para su uso en el tratamiento, particularmente en el tratamiento de un trastorno inmunológico, autoinmune y/o inflamatorio, por ejemplo la artritis, tal como la artritis inflamatoria en particular la artritis reumatoide o la espondilitis anquilosante.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra varias secuencias relacionadas con anticuerpos y fragmentos de unión de la presente descripción

Las figuras 2a y 2b muestran las curvas de titulación para Fab de ratón CA2109 (fwk18 FAB) IgG1 (fwk18 IgG)

Las figuras 3 y 4 muestran diversas alineaciones de

secuencia relacionadas con anticuerpos y fragmentos de unión de la presente descripción.

Descripción Detallada de la Invención

El TNF como se emplea en la presente descripción se
5 refiere al factor alfa de necrosis tumoral de citoquina, cuya
secuencia de aminoácidos humana está en UniProt con el número
P01375.

La molécula del anticuerpo como se emplea en la
presente descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento
10 de unión del mismo.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente
descripción, se refiere en general a anticuerpos intactos
(enteros), es decir, que comprenden los elementos de dos
cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El anticuerpo puede
15 comprender otros dominios de unión adicionales, por ejemplo
según la molécula DVD-Ig como se describe en el documento WO
2007/024715, o el así denominado (FabFv)₂Fc descrito en el
documento WO2011/030107. De este modo, los anticuerpos como
se emplean aquí incluyen los anticuerpos bi, tri o
20 tetraivalentes de longitud completa.

Los fragmentos de unión de anticuerpos incluyen los
anticuerpos de cadena sencilla (es decir, de cadena pesada y
cadena ligera de longitud completa); Fab, Fab modificado,
Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv,
25 anticuerpos de dominio único (por ejemplo VH o VL o VHH),

scFv, dsscFv, anticuerpos bi, tri o tetra-valentes, Bis-scFv, diacuerpos, tricuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). El formato Fab-Fv se describió por primera vez en el documento WO2009/040562 y las versiones estabilizadas con disulfuro del mismo, el Fab-dsFv se describió por primera vez en WO2010/035012. Otros fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos de Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacionales WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, WO92/22583 y WO05/113605). Un ejemplo de este último es un Tri-Fab (o TFM) como se describe en WO92/22583.

En una modalidad, se proporciona un fragmento de Fab.

En una modalidad, se proporciona un fragmento de Fab'.

Una molécula de Fab' típica comprende un par de cadena pesada y ligera en donde la cadena pesada comprende una región variable V_H , una C_H1 de dominio constante y una región de articulación natural o modificada y la cadena
5 ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L .

En una modalidad, se proporciona un dímero de un Fab' de acuerdo con la presente descripción para crear un $F(ab')_2$, por ejemplo, la dimerización puede ser a través de
10 la articulación.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un dominio de unión. Un dominio de unión generalmente comprenderá 6 CDR, tres de una cadena pesada y tres de una cadena ligera. En una modalidad, las CDR
15 están en una estructura y juntas forman una región variable. Por lo tanto, en una modalidad, un anticuerpo o fragmento de unión comprende un dominio de unión específico para el antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada.

20 Se apreciará que una o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos se pueden hacer a las CDR u otras secuencias (por ejemplo, dominios variables) proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo
25 para unirse al TNF. El efecto de cualesquiera sustituciones,

adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos puede ser probado fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en la presente descripción, en particular en los ejemplos, para determinar la unión/bloqueo
5 de TNF.

Además, se pueden hacer una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en la región estructural de la cadena pesada y/o ligera empleada en el anticuerpo o
10 fragmento proporcionado por la presente invención y en donde la afinidad de unión a TNF es retenida o aumentada.

Los residuos en los dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se expone en
15 Kabat et al, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de América, NIH, EUA (en adelante "Kabat et al. (*supra*)"). Este sistema de numeración se usa en la presente especificación, excepto que se indique de otra
20 manera.

Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos
25 adicionales que en la numeración estricta de Kabat

correspondiente a un acortamiento de, o la inserción en un componente estructural, ya sea de un soporte o región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La correcta numeración de
5 residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada se
10 encuentran en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M.J. Mol. Biol, 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el
15 residuo 26 al residuo 32. Por lo tanto, a menos que se indique de otra manera "CDR-H1" como se emplea en la presente descripción está propuesta para referirse a los residuos 26 a 35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición del ciclo topológico de
20 Chothia.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están ubicadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

25 Los anticuerpos y fragmentos de la presente

descripción bloquean la unión y/o señalización de TNF. El bloqueo como se emplea en la presente descripción se refiere al bloqueo físico tal como ocluir el receptor pero también incluirá cuando el anticuerpo o los fragmentos se unen a un
5 epítipo que causa, por ejemplo, un cambio conformacional que significa que el ligando natural del receptor ya no se una. Las moléculas del anticuerpo de la presente invención se unen a TNF y de ese modo disminuyen o evitan (por ejemplo, inhiben/neutralizan) la unión de TNF a su objetivo/receptor.

10 Los anticuerpos para su uso en la presente descripción se pueden obtener usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido/proteína de TNF que incluye proteínas de fusión, células (que expresan recombinante o naturalmente) el polipéptido (tales como
15 células T activadas) puede usarse para producir anticuerpos que reconocen específicamente TNF. El polipéptido puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento o derivado biológicamente activo del mismo.

Los polipéptidos, para su uso para inmunizar un
20 hospedero, se pueden preparar por los procesos bien conocidos en la técnica a partir de las células hospedadoras modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o se pueden recuperar de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término
25 "polipéptidos" incluye los péptidos, polipéptidos y

proteínas. Estos se usan indistintamente, a menos que se especifique de otra manera. El polipéptido de TNF puede ser parte en algunos casos de una proteína más grande tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una etiqueta
5 de afinidad o similar.

Se pueden obtener anticuerpos generados contra el polipéptido de TNF, en donde es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando los protocolos
10 bien conocidos y de rutina, véase por ejemplo el Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como los conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser
15 inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más adecuados.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature,
20 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor et al. 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica del EBV-hibridoma (Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp.77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

25 Los anticuerpos para su uso en la invención también

se pueden generar usando métodos de anticuerpo de linfocito único clonando y expresando los ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos
5 mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional número WO2004/106377.

La selección de los anticuerpos puede realizarse
10 usando ensayos para medir la unión a TNF humano y/o los ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de TNF al receptor. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA. Los ejemplos de ensayos de4 antagonistas y de bloqueo adecuados se describen en los ejemplos a continuación.

15 Específico tal como se emplea en la presente descripción está propuesto para referirse a un anticuerpo que solo reconoce el antígeno para el cual el mismo es específico o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno para el cual el mismo es
20 específico en comparación con la unión a los antígenos para los cuales el mismo que no es específico, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor que la afinidad de unión. La afinidad de unión puede medirse por técnicas tales como BIAcore como se describe a continuación en la presente
25 descripción.

Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de polinucleótidos de ciertos anticuerpos de acuerdo con la presente descripción se proporcionan y forman un aspecto de la invención.

5 Por lo tanto, en un aspecto se proporciona un anticuerpo de anti-TNF o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde la región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas
10 independientemente de la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2 y la SEC ID NO: 3, por ejemplo en donde CDR H1 es la SEC ID NO: 1, CDR H2 es la SEC ID NO: 2 y/o CDR H3 es la SEC ID NO: 3.

 Así, una modalidad CDR H1 es la SEC ID NO: 1 y CDR H2 es la SEC ID NO: 2, o CDR H1 es la SEC ID NO: 1 y CDR H3
15 es la SEC ID NO: 3, o CDR H2 es la SEC ID NO: 2 y CDR H3 es la SEC ID NO: 3.

 En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de unión según la presente descripción comprenden una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región
20 variable, por ejemplo que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente de la SEC ID NO: 4 a 10, en particular en donde CDR L1 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5, CDR L2 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 y CDR L3 tiene la secuencia dada en la SEC ID NO:
25 10.

Así, en una modalidad CDR L1 es la SEC ID NO: 4 y CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9, CDR L1 es la SEC ID NO: 5 y CDR L2 s SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 o CDR L1 es la SEC ID NO: 4 o 5 y CDR L3 es la SEC ID NO: 10; o CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 o CDR L1 es la SEC ID NO: 10.

En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de unión de acuerdo con la presente descripción comprenden secuencias de CDR seleccionadas de la SEC ID NOs: 1 a 10, por ejemplo, en donde CDR H1 es la SEC ID NO: 1, CDR H2 es la SEC ID NO: 2, CDR H3 es la SEC ID NO: 3, CDR L1 es la SEC ID NO: 4 o 5, CDR L2 es la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 y CDR L3 es la SEC ID NO: 10.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada que tiene 3 CDR de cadena pesada y la secuencia de CDRH1 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 1, la secuencia de CDRH2 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 y la secuencia de CDRH3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 3.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera que tiene tres CDRS de cadena ligera y la secuencia de CDRL1 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 5, la secuencia de CDRL2 tiene al menos 60% de

identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 o SEC ID NO: 9 y la secuencia de CDRL3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 10.

5 En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de unión según la presente descripción son completamente humanos, por ejemplo preparados a partir de una biblioteca de fagos o similar.

 En una modalidad, el anticuerpo o fragmentos según
10 la descripción son humanizados.

 Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región
15 estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos US 5,585,089; W091/09967). Se apreciará que puede ser necesario solamente transferir los residuos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo,
20 Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente además uno o más residuos estructurales derivados de las especies no humanas de las cuales se derivaron las CDR. Estos últimos a menudo se denominan residuos donadores.

25 Por lo tanto, en una modalidad como se usa en el

presente documento, el término "molécula de anticuerpo humanizada" se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo no humano tal como un anticuerpo monoclonal de murino) injertado en una estructura de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo un anticuerpo humano) que comprende opcionalmente además uno o más residuos estructurales derivados de las especies no humanas de las que se derivaron las CDR (residuos donadores). Para una revisión, véase Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. En una modalidad en lugar de transferir la CDR completa, solo uno o más de los residuos que determinan la especificidad de cualquiera de las CDR descritas anteriormente son transferidos a la estructura del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). En una modalidad, solo los residuos que determinan la especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en la presente descripción se transfieren a la estructura del anticuerpo humano. En otra modalidad, solo los residuos que determinan la especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente se transfieren a la estructura del anticuerpo humano.

25 Cuando las CDR o los residuos que determinan la

especificidad se injertan, se puede usar cualquier secuencia de la estructura de región variable aceptora apropiada teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donador a partir del cual se derivan las CDR, incluyendo las regiones
5 de la estructura del ratón, primate y ser humano.

Adecuadamente, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones de la estructura del aceptoras humanas así como una o más de las CDR proporcionadas específicamente en
10 este documento. Por lo tanto, se proporciona en una modalidad el bloqueo del anticuerpo humanizado que se une a TNF humano en donde el dominio variable comprende regiones de la estructura del aceptor humano y las CDR del donador no humano.

15 Los ejemplos de las estructuras humanas que pueden usarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la
20 cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden usar secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles en <http://www.imgt.org/>.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas ligera y pesada del aceptor no
25 necesitan necesariamente derivarse del mismo anticuerpo y, si

se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

Una de tales regiones de la estructura adecuadas para la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva de la estructura del aceptor VK1
5 2-1(U) A20 JK2 o VH3 1-3 3-21 JH4 (SEC ID NO: 25 y 26 respectivamente).

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR
10 seleccionadas de la secuencia dada en la SEC ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para CDRH3, en donde la región de la estructura de la cadena pesada se deriva de la estructura del aceptor humano VH3 1-3 3-21 JH4 (SEC ID NO:
15 26).

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para
20 CDRH3, en donde la región de la estructura de la cadena pesada se deriva de la estructura del aceptor humano VH3 1-3 3-21 JH4 (SEC ID NO: 26).

En un ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia dada en la SEC ID NO:
25 12, 16 o 28, tal como 12 o 16.

Una región la estructura adecuada para la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva de la estructura del aceptor humano VK1 2-1(U) A20 JK2 (SEC ID NO: 25).

5 Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 10 para CDRL3, en donde la región de la estructura de la
10 cadena ligera se deriva de la estructura del aceptor humano VK1 2-1(U) A20 JK2.

 En un ejemplo, el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 11, 15 o 27, tal como 11 o 15. En un ejemplo, el dominio
15 variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 29.

 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión comprende una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 12 y una secuencia de región variable de cadena
20 ligera de la SEC ID NO: 11.

 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión comprende una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 12 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 29.

25 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de

unión comprende una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 16 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 15.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de
5 unión comprende una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 28 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 27.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones estructurales no necesitan tener
10 exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden ser cambiados a residuos que están presentes más frecuentemente para esta clase o tipo de cadena aceptora.

Alternativamente, los residuos seleccionados en las
15 regiones de la estructura del aceptor pueden cambiarse de modo que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Tales cambios deben mantenerse en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del
20 anticuerpo donador. En WO91/09967 se establece un protocolo para seleccionar residuos en las regiones de la estructura del aceptor que pueden necesitar ser cambiados.

Por lo tanto, en una modalidad, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos en la estructura de cadena pesada y/o
25 ligera se reemplazan con un residuo de aminoácido

alternativo.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos uno de los residuos en las posiciones 24, 48, 49 71, 73, 78 y 93 del dominio variable de la cadena pesada (numeración de Kabat) son
5 residuos donadores, véase por ejemplo, la secuencia dada en la SEC ID NO: 12 o SEC ID NO: 28.

En una modalidad, el residuo 24 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido
10 alternativo, por ejemplo treonina.

En una modalidad, el residuo 48 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, isoleucina.

En una modalidad, el residuo 49 del dominio
15 variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, glicina.

En una modalidad, el residuo 71 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza por un aminoácido alternativo, por ejemplo valina.

20 En una modalidad, el residuo 73 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo lisina.

En una modalidad, el residuo 78 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido
25 alternativo, por ejemplo alanina.

En una modalidad, el residuo 93 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo treonina.

En una modalidad, el residuo 48 es la isoleucina,
5 el residuo 49 es la glicina, el residuo 71 es valina, el residuo 73 es lisina, el residuo 78 es alanina y el residuo 93 es treonina en la región variable de cadena pesada humanizada según la presente descripción.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un
10 anticuerpo humanizado, en donde al menos los residuos en cada una de las posiciones 48, 49 71, 73, 78 y 93 del dominio variable de la cadena pesada (numeración de Kabat) son residuos donadores, véase por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 12.

15 En un ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos los residuos en cada una de las posiciones 24, 48, 49, 71, 73, 78 y 93 del dominio variable de la cadena pesada (numeración de Kabat) son residuos donadores, véase por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID
20 NO: 28.

En un ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde uno o más de los residuos en las posiciones 65, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración de Kabat) son residuos donadores, véase
25 por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 11 o la SEC ID

NO: 27.

En un ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos los residuos en cada una de las posiciones 65, 71 y 87 del dominio variable de la cadena
5 ligera (numeración de Kabat) son residuos donadores, véase por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 11.

En una modalidad, el residuo 65 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo treonina.

10 En una modalidad, el residuo 71 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con un aminoácido alternativo, por ejemplo, tirosina.

En una modalidad, el residuo 87 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con un aminoácido
15 alternativo, por ejemplo, fenilalanina.

En una modalidad, el residuo 65 es treonina, el residuo 71 es tirosina y el residuo 87 es fenilalanina en la región variable de cadena ligera humanizada de acuerdo con la presente descripción.

20 En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos
80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
25 de identidad o similitud con una secuencia de la presente

descripción, por ejemplo, la secuencia dada en la SEC ID NO: 12, 16 o 28.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEC ID NO: 11, 15 o 27.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 12, 15 o 28 pero en donde la molécula del anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para CDR-H3.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena ligera que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la secuencia en la SEC ID NO: 11, 15 o 27 pero en

donde la molécula del anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 10 para CDR-L3.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento,
10 por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 12 y un dominio variable de cadena ligera que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 11 pero en donde la molécula
15 de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEC ID N°: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2, la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para CDR-H3, la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en
20 la SEC ID NO: 10 para CDR-L3.

 En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento,
25

por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID N°: 16 y un dominio variable de cadena ligera que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% similares o idénticos a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la

5 secuencia dada en la SEC ID N°: 15 pero en donde la molécula de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEC ID N°: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2, la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para CDR-H3, la secuencia dada en la SEC ID NO: 4 o 5 para CDR-L1, la secuencia dada en

10 la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 10 para CDR-L3.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a TNF humano en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada que

15 es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID NO: 28 y un dominio variable de cadena ligera que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% similares o idénticos

20 a una secuencia dada en este documento, por ejemplo la secuencia dada en la SEC ID N°: 27 pero en donde la molécula de anticuerpo tiene la secuencia dada en la SEC ID N°: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEC ID NO: 2 para CDR-H2, la secuencia dada en la SEC ID NO: 3 para CDR-H3, la secuencia

25 dada en la SEC ID NO: 4 o 5 para CDR-L1, la secuencia dada en

la SEC ID NO: 6, 7, 8 o 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEC ID NO: 10 para CDR-L3.

"Identidad", como se usa en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias
5 alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina
10 puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden sustituirse entre sí incluyen, pero no están limitados a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- 15 - lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas
20 laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press,
25 Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome

Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993;
 Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y
 Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994;
 Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G.,
 5 Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.
 y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el
 software BLAST™ disponible de NCBI. (Altschul, SF et al.,
 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. y States, D.J.
 1993, Nature Genet., 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996,
 10 Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997,
 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L.
 1997, Genome Res. 7:649-656).

Las moléculas de anticuerpos de la presente
 invención pueden comprender una molécula de anticuerpo
 15 completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud
 completa o un fragmento de las mismas y pueden ser, pero no
 se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado,
 F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o
 VL o VHH), scFv, dsscFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes,
 20 Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos
 de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores (véase
 por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech., 23
 (9):1126-1136, Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews -
 Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar
 25 estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la

técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos de Fab y Fab' descritos en las solicitudes de
5 patente internacionales WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853, WO05/113605,
10 WO2009/040562 y WO2010/035012).

En un ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende cualquiera de los anticuerpos de anti-TNF o los fragmentos de unión del mismo descritos en este documento. El anticuerpo multiespecífico
15 puede tener cualquier formato de anticuerpo adecuado que sea capaz de unirse a dos o más antígenos. Los ejemplos de formatos de anticuerpos multiespecíficos son conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, y se pueden seleccionar de: un diacuerpo, scdiacuerpo, triacuerpo, scFv
20 en serie, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsscFv, Fab-(dsscFv)₂, FabFvFv, FabFvFc, diFab, diFab', tricuerpo, scFv-Fc en serie, scFv-Fc-scFv, scdiacuerpo-Fc, scdiacuerpo-CH₃, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, Duocuerpo y DVD-Ig. En un
25 ejemplo, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo estabilizado con disulfuro como se describe en WO2015/197772.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de anticuerpo multiespecífica como un dímero que comprende o consiste de:

a) una cadena polipeptídica de fórmula (I):

5 $V_{H1}-CH_1-X-V_1-$; y

b) una cadena de polipéptido de la fórmula (II):

$V_{L1}-C_L-Y-V_2-$

en donde:

V_{H1} representa un dominio variable de cadena pesada;

10 CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un enlazador;

Y representa un enlace o un enlazador;

V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

15 V_{L1} representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como C_{kappa} ;

V_2 representa dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv

20 en donde V_{H1} y V_{L1} juntos forman un dominio de unión específico para un primer antígeno y V_1 y V_2 se unen cada uno a un segundo y tercer antígenos respectivamente y en donde al menos uno de los antígenos es TNF.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo es un scFv que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 21.

25 En un ejemplo, la molécula de anticuerpo comprende

una o más moléculas de scFv que comprenden las secuencias dadas en la SEC ID NO: 11 y 12, SEC ID NO: 15 y 16 y/o la secuencia dada en la SEC ID NO: 21.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de Fab o Fab' del anticuerpo que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NO: 11 y 12, por ejemplo para la cadena ligera y pesada, respectivamente.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de Fab o Fab' del anticuerpo que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NO: 15 y 16, por ejemplo para la cadena ligera y pesada, respectivamente.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo de Fab o Fab' que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NO: 27 y 28, por ejemplo para la cadena ligera y pesada, respectivamente.

Se apreciará que las moléculas de scFv y Fab de la descripción se pueden incorporar en cualquier molécula de anticuerpo multiespecífica adecuada como se describió anteriormente en la presente descripción, por ejemplo, la molécula de anticuerpo multiespecífica que tiene la fórmula I y II anteriores.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la

presente descripción es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NO. 11 y 12, por ejemplo, para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente.

5 En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo IgG1 de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NO. 15 y 16, por ejemplo, para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente.

10 En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo IgG1 de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID N°: 27 y 28, por ejemplo para la cadena ligera y pesada, respectivamente.

15 En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un formato de IgG4 de longitud completa. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un formato de IgG4P de longitud completa.

20 En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo IgG4 o IgG4P de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las SEC ID NOs: 11 y 12, por ejemplo para la cadena ligera y pesada, respectivamente.

25 IgG4P como se emplea aquí es una mutación del

isotipo IgG4 de tipo silvestre en donde el aminoácido 241 se reemplaza por prolina, véase por ejemplo en donde la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108.

5 En una modalidad, el anticuerpo según la presente descripción se proporciona como una proteína de fusión del anticuerpo de unión a TNF que comprende un residuo de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento de Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) unidos directa o
10 indirectamente al mismo, por ejemplo como se describe en WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091 todos incorporados aquí como referencia.

 En una modalidad, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo como un agrupamiento
15 por pares de cadena pesada variable (VH) y de cadena ligera variable (VL), unido opcionalmente mediante un enlace disulfuro.

 En una modalidad, el elemento de Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma especificidad o similar al
20 anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una modalidad, Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una modalidad, una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un
25 sitio de unión a la albúmina, por ejemplo, un par VH/VL en el

mismo proporciona un sitio de unión a la albúmina.

En una modalidad, el Fab o Fab' de acuerdo con la presente descripción se conjuga con una molécula de PEG o albúmina del suero humano.

5 Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula del anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de
10 la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios de la región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos de IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del
15 anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo se destina a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Se apreciará que también pueden usarse variantes de la secuencia de estos dominios de región constante. Por
20 ejemplo, pueden usarse moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Los expertos en la técnica también entenderán que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de
25 modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de

estas modificaciones a menudo depende de la línea celular del
hospedero utilizada para expresar el anticuerpo, así como las
condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir
variaciones en la glucosilación, oxidación de metionina,
5 formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y
desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la
pérdida de un residuo básico carboxi terminal (tal como
lisina o arginina) debido a la acción de las
carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ, Journal of
10 Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la
lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede
estar ausente.

En una modalidad, la cadena pesada del anticuerpo
comprende un dominio CH1, por ejemplo la secuencia CH1
15 mostrada en la SEC ID NO: 34, y la cadena ligera del
anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda,
por ejemplo la secuencia CL mostrada en la SEC ID NO: 33.

En una modalidad, la cadena pesada del anticuerpo
comprende una región constante de longitud completa que
20 comprende los dominios CH1, CH2 y CH3, por ejemplo, la
secuencia de la región constante gamma 1 mostrada en la SEC
ID NO: 35 o la secuencia de la región constante gamma 4
mostrada en la SEC ID NO: 36 o SEC ID NO: 37 y la cadena
ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o
25 lambda, por ejemplo, la secuencia CL mostrada en la SEC ID

NO: 33.

En una modalidad, un aminoácido C-terminal de la molécula de anticuerpo se escinde durante las modificaciones posteriores a la postraducción.

5 En una modalidad, un aminoácido N-terminal de la molécula de anticuerpo se escinde durante las modificaciones posteriores a la traducción.

También se proporciona mediante la presente invención una región específica o epítipo de TNF humano que
10 está unido por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo o fragmento de unión que comprende:

- la secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 12 y la secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 11,
- 15 • la secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 16 y la secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 15, o
- La secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 28 y la secuencia de cadena ligera de SEC ID NO: 27.

Esta región específica o epítipo del polipéptido de
20 TNF humano se puede identificar mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen seleccionar péptidos de longitudes variables
25 derivadas de TNF para unirse al anticuerpo de la presente

invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítopo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de TNF pueden producirse sintéticamente o mediante digestión proteolítica del polipéptido de TNF. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar mediante, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, la espectroscopía de RMN o la cristalografía de rayos X se pueden usar para identificar el epítopo unido por un anticuerpo de la presente invención. En un ejemplo en donde se usa cristalografía de rayos X, el epítopo se determina como los residuos en el polipéptido de TNF que están dentro de 4 Å del anticuerpo. En un ejemplo, el epítopo se determina como aquellos residuos en el polipéptido TNF que están dentro de los 5 Å del anticuerpo. Una vez identificado, el fragmento del epítopo que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede usar, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítopo.

En una modalidad, los anticuerpos que se unen al epítopo descrito aquí anteriormente proporcionados por la presente invención son completamente humanos. En una modalidad, los mismos son humanizados. En un ejemplo, tienen una afinidad por el TNF humano de 150 pM o menos, típicamente de 130 pM o menos.

Los anticuerpos que bloquean transversalmente la unión de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en particular, una molécula de anticuerpo que comprende:

5 la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 12 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEC ID NO: 11,

 la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 16 y la secuencia de la cadena ligera dada en
10 la SEC ID NO: 15, o

 la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 28 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEC ID NO: 27

puede ser similarmente útil para bloquear la actividad de
15 TNF. De acuerdo con esto, la presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo de anti-TNF, que bloquea cruzadamente la unión de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas anteriormente en la presente descripción al TNF humano y/o se bloquea cruzadamente para
20 unirse al TNF humano por uno de estos anticuerpos. En una modalidad, el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente en la presente descripción. En otra modalidad, el anticuerpo neutralizante del bloqueo cruzado se une a un epítipo que limita y/o se solapa con el
25 epítipo unido por un anticuerpo descrito anteriormente en la

presente descripción.

Los anticuerpos de bloqueo cruzado pueden identificarse usando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, usando ensayos de competencia de ELISA o BIAcore en donde la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado al TNF humano impide la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa. Los ensayos de bloqueo cruzado pueden usar TNF natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la unión y el bloqueo cruzado se miden usando TNF recombinante humano.

En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende:

la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 12 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEC ID NO: 11,

la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 16 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEC ID NO: 15, o

la secuencia de la cadena pesada proporcionada en la SEC ID NO: 28 y la secuencia de la cadena ligera dada en la SEC ID NO: 27

en más del 80%, por ejemplo en más del 85%, tal como en más del 90%, en particular en más del 95% de inhibición.

En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención son completamente humanos. En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención son humanizados. En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención tienen una afinidad por el TNF humano de 150 pM o menos, 130 pM o menos o 100pM o menos. En una modalidad, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención tienen una afinidad por el TNF humano de 50 pM o menos. La afinidad se puede medir usando los métodos descritos a continuación en este documento.

Las moléculas biológicas, como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, lo que da a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga "observada" global dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una molécula particular o superficie accesible al disolvente del mismo no lleva carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo de TNF y los fragmentos de la invención pueden diseñarse para tener un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular

perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de TNF humanizado diseñado para tener un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo originalmente identificado. El anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, por ingeniería genética mediante la sustitución de un residuo de aminoácido tal como la sustitución de un residuo de aminoácido ácido por uno o más residuos de aminoácidos básicos. Alternativamente, pueden introducirse residuos de aminoácidos básicos o pueden eliminarse residuos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, pueden introducirse residuos ácidos para disminuir el pI, según se requiera. Es importante que al manipular el pI se tenga cuidado para retener la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

20 Programas como ** ExPASy
http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, y http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, se pueden usar para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento. Alternativa o adicionalmente, el pI puede medirse
 25 usando cualquier técnica de laboratorio estándar adecuada.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular en el intervalo nanomolar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la
5 técnica, que incluye BIAcore, como se describe en los ejemplos de la presente descripción, usando TNF natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la afinidad se mide usando TNF humano recombinante.

10 Adecuadamente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por TNF humano aislado de aproximadamente 1 nM o inferior. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 pM o
15 inferior (es decir, mayor afinidad). En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 250 pM o inferior. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200
20 pM o inferior. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 150 pM o inferior. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TNF con una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o inferior. En una
25 modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo

anti-TNF humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o inferior. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TNF con una afinidad de unión de 50 pM o inferior.

5 La afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención, así como la medida en la que un agente de unión (tal como un anticuerpo) inhibe la unión, puede determinarse por un experto en la técnica usando técnicas convencionales, por ejemplo aquellas descritas por
10 Scatchard et al. (Ann. KY. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) o mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando sistemas tales como BIAcore. Para la resonancia de plasmón superficial, las moléculas objetivo se inmovilizan en una fase sólida y se exponen a ligandos en una fase móvil que se
15 extiende a lo largo de una celda de flujo. Si se produce la unión del ligando al objetivo inmovilizado, el índice de refracción local cambia, lo que lleva a un cambio en el ángulo de SPR, que puede controlarse en tiempo real al detectar los cambios en la intensidad de la luz reflejada.
20 Las velocidades de cambio de la señal de SPR se pueden analizar para producir constantes de la velocidad aparente para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La relación de estos valores proporciona la constante de equilibrio aparente (afinidad) (véase, por ejemplo, Wolff
25 et al., Cancer Res. 53: 2560-65 (1993)).

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente invención, por lo tanto, también se refiere a

5 variantes de las moléculas del anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por TNF. Las variantes se pueden obtener mediante varios protocolos de maduración de afinidad que incluyen hacer mutar las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), el mezclado de la

10 cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), el mezclado del ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol, 8, 724-733, 1997), presentación de fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol, 256, 77-88, 1996) y PCR

15 sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. {supra} describe estos métodos de maduración de afinidad.

En una modalidad, las moléculas del anticuerpo de la presente invención bloquean la actividad del TNF humano.

20 Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear el TNF ya son conocidos en la técnica.

Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención se puede conjugar con una o más

25 molécula(s) efectora(s). Se apreciará que la molécula

efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de manera que formen un único residuo que pueda unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo

5 unido a una molécula efectora, se puede preparar mediante procesos de ADN recombinante o químico estándares en los que el fragmento del anticuerpo se une directamente o mediante un agente de unión a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien

10 conocidos en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª edición, Robinson et al., Eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procesos químicos particulares incluyen, por

15 ejemplo, los descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede lograr usando procesos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y

20 EP0392745.

El término molécula efectora como se usa en este documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de

25 anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos

nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo el ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente yoduro de radio, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos
 5 fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de las moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para [por ejemplo para
 10 matar) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido,
 15 tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxortubicina, daunorrubicina, dihidroxiantranodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de
 20 los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo
 25 mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina

(BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y
 5 doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir
 10 radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto ^{213} , Californio ^{252} , Iridio ^{192} y Tungsteno ^{188} /Renio ^{188} ; o fármacos tales como, entre otros, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas,
 15 péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A,
 20 exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno del tejido, un agente trombótico o
 25 un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o

endostatina, o un modificador de la respuesta biológica, como una linfoquina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de las colonias de macrófagos de los granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la patente U.S. N° 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y

aecuatorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento W005/117984.

En donde la molécula efectora es un polímero, el mismo puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo, una cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituida. Un polímero de polialquileno, polialquileno o polioxialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) alcohol polivinílico de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como

metoxipoli(etilenglicol) o sus derivados.

Los polímeros específicos que se producen naturalmente incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

5 En una modalidad, el polímero es la albúmina o un fragmento de la misma, tal como la albúmina de suero humano o un fragmento de la misma.

 "Derivados", como se usa en la presente descripción, está propuesta para incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo se puede unir directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo del grupo formará en algunos casos parte del producto como el grupo de unión entre el
10 fragmento del anticuerpo y el polímero.
15

 El tamaño del polímero puede hacer variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del
20 polímero puede seleccionarse particularmente sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizar ciertos tejidos, tales como tumores o extender la semivida en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Así, por
25 ejemplo, cuando el producto está destinado a salir de la

circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención se unen a los residuos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier grupo funcional de aminoácido de cadena lateral o aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier amino, imino, tiol, hidroxilo o grupo carboxilo. Tales aminoácidos pueden aparecer de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse por ingeniería genética en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5,219,996, 5,667,425, WO98/25971,

WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento de Fab modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de uno o más aminoácidos de la cadena pesada para permitir la
5 unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

10 Adecuadamente, las moléculas de PEG se unen covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de
15 un residuo de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace de disulfuro o, en particular, un enlace de azufre-carbono. En donde se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados
20 selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga
25 un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -

halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Los materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc.,
5 Huntsville, AL, EUA) O pueden prepararse a partir de los materiales de partida comercialmente disponibles usando procesos químicos convencionales. Las moléculas particulares de PEG incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que se puede obtener de Nektar, antiguamente Pardela; Rapp Polymere; y SunBio) y M-
10 PEG-SPA (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater).

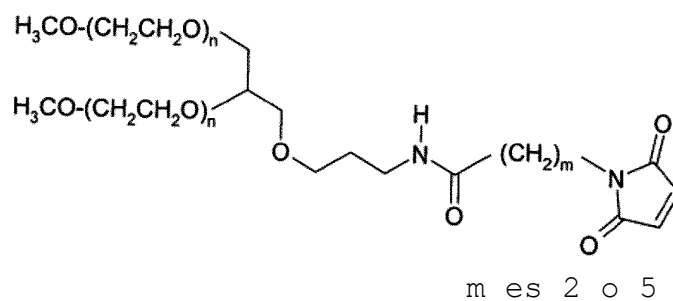
En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento de Fab modificado, fragmento de Fab' o diFab que está PEGilado, es decir, tiene un PEG (poli(etilenglicol)) unido
15 covalentemente al mismo, por ejemplo según el método descrito en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Boimedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological
20 Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:
25 531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en

la región de articulación. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región de articulación modificada. Un residuo de lisina puede unirse
 5 covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento de Fab puede ser, por lo tanto, de
 10 aproximadamente 40,000 Da.

Las moléculas de PEG particulares la incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etil amida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) PM 20,000), también conocida como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, anteriormente
 15 Shearwater).

Las fuentes alternativas de enlazadores de PEG incluyen NOF que suministran GL2-400MA3 (en donde m en la estructura siguiente es 5) y GL2-400MA (en donde m es 2) y n es aproximadamente 450:

20

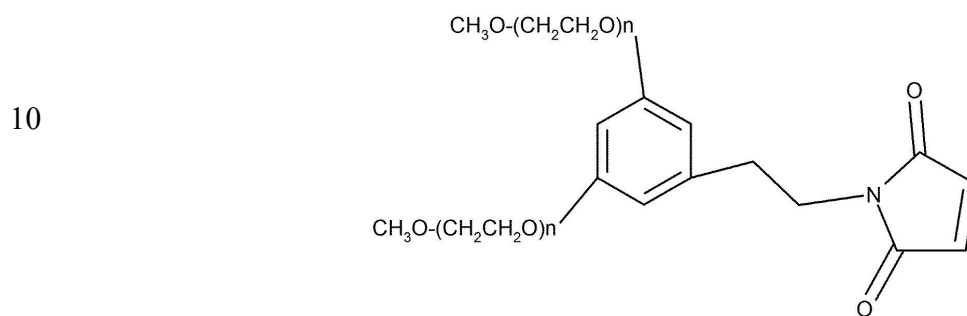


25

Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20,000 Da.

Por lo tanto, en una modalidad, el PEG es 2,3-Bis
 (metilpolioxietileno-oxi)maleimido-1-
 oxohexil)amino]propiloxi} hexano (el PEG ramificado de 2
 brazos, $-\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{-MAL}$, Pm 40,000 conocido como
 5 SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del
 siguiente tipo:



están disponibles del Dr. Reddy, NOF y Jenkem.

15 En una modalidad, se proporciona un anticuerpo que
 está PEGilado (por ejemplo con un PEG descrito en este
 documento), unido a través de un residuo de aminoácido de
 cisteína en o alrededor del aminoácido 232 en la cadena, por
 ejemplo, el aminoácido 232 de la cadena pesada (por
 20 numeración de la secuencia).

En una modalidad, la presente descripción
 proporciona una molécula de Fab'-PEG que comprende uno o más
 polímeros de PEG, por ejemplo 1 o 2 polímeros tales como un
 polímero o polímeros de 40 kDa.

25 Las moléculas de Fab'-PEG de acuerdo con la

presente descripción pueden ser particularmente ventajosas porque tienen una semivida independiente del fragmento Fc. En un ejemplo, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad mejorada bloqueando el TNF humano que
5 comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TNF o el fragmento de unión del mismo en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo tiene una semivida que es independiente de la unión a Fc a TNF.

En una modalidad, se proporciona un Fab' conjugado
10 con un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

En una modalidad, se proporciona un scFv conjugado con un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

15 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento se conjuga con una molécula de almidón, por ejemplo para aumentar la semivida. Los métodos para conjugar el almidón a una proteína son como se describe en el documento US 8,017,739 incorporado aquí como referencia.

20 La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de
25 anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de

la presente invención puede comprender un ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El ADN que codifica las secuencias de la estructura del aceptor está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y puede sintetizarse fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. La mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar según corresponda.

Los ejemplos de secuencias de ADN adecuadas se proporcionan en este documento.

Los ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la región variable de la cadena ligera de 2109 gL18 se proporcionan en la SEC ID NO: 13 y la SEC ID NO: 17.

Los ejemplos de las secuencias de ADN adecuadas que
5 codifican la región variable de la cadena pesada de 2109 gH2 se proporcionan en la SEC ID NO: 14 y la SEC ID NO: 18.

Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de Fab o fragmento
10 de Fab' de la presente invención que comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 13, 17, 14 o 18 (tal como 13 y 14 o 17 y 18).

En un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y la
15 cadena ligera de un anticuerpo IgG4(P) de la presente invención en la cual el ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 13 o 17 y el ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 14 o 18.

20 En un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo IgG1 de la presente invención en la cual el ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 13 o 17 y el ADN
25 que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en

la SEC ID NO: 14 o 18.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo Fab-dsFv de la presente
5 invención en donde el ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEC ID N°: 13 o 17 y el ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEC ID NO: 14 o 18.

La presente invención también se refiere a un
10 vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, el vector
15 de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente, y las secuencias de la señal adecuadas. En un ejemplo, el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas
20 pesada y ligera (véase el documento WO03/048208).

Los métodos generales mediante los cuales pueden construirse los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current
25 Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed),

Wiley Interscience, Nueva York y Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula hospedera que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que
5 comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una célula hospedera para la expresión de un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende:

10 i) una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo, y

ii) una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo

en donde las secuencias de ADN se proporcionan en uno o más
15 vectores de clonación o expresión.

Se puede usar cualquier sistema de célula hospedera/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo de
20 *E. coli*, y otros sistemas microbianos (especialmente para expresar fragmentos de anticuerpos o sistemas de expresión de células hospedadoras eucariotas, por ejemplo de mamíferos, (especialmente para expresar anticuerpos de longitud completa). Las células hospederas de mamífero adecuadas
25 incluyen CHO, mieloma o células del hibridoma.

Los tipos adecuados de células del ovario de hámster chino (células CHO) para su uso en la presente invención pueden incluir células de CHO y CHO-K1 que incluyen células dhfr-CHO, tales como células CHO-DG44 y células CHO-DXB11, que se pueden usar con un marcador seleccionable de DHFR o células CHOK1-SV que pueden usarse con un marcador seleccionable de glutamina sintetasa. Otros tipos de células de uso en la expresión de anticuerpos incluyen líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NSO y células SP2, células COS.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedera que contiene un vector o vectores de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislamiento de la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita usar una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica

un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, el vector que incluye las secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y
5 de cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos según la presente descripción se expresan a buenos niveles a partir de las células hospedadoras. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos son propicias para el
10 procesamiento comercial.

Por lo tanto, se proporciona un proceso para cultivar una célula hospedera y expresar un anticuerpo o fragmento de la misma, aislar la última y opcionalmente purificar la misma para proporcionar un anticuerpo o
15 fragmento aislado. En una modalidad, el proceso comprende además la etapa de conjugar una molécula efectora con el anticuerpo o fragmento aislado, por ejemplo por la conjugación a un polímero de PEG en particular como se describe en este documento.

20 En una modalidad, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención) que comprende las etapas de: realizar la cromatografía de intercambio aniónico en modo no vinculante de modo que las impurezas sean
25 retenidas en la columna y el anticuerpo es eluido.

Por lo tanto, la etapa o etapas del cromatógrafo pueden incluir una o más etapas de lavado, según corresponda.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de filtración, tal como una etapa de
5 diafiltración.

Así, en una modalidad, se proporciona un anticuerpo o fragmento de anti-TNF purificado, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento humanizado, en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, en una
10 forma sustancialmente purificada en particular, libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o la proteína o ADN de la célula hospedera.

La forma purificada como se usa *supra* está propuesta para referirse a al menos un 90% de pureza, tal
15 como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más puro.

Sustancialmente libre de endotoxina generalmente se refiere a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 0.5 o 0.1 UE por mg de producto.

20 Sustancialmente libre de proteína o ADN de célula hospedera generalmente está propuesto para referirse a la proteína de célula hospedera y/o al contenido de ADN de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 10 µg por mg o menos, en particular 2 µg por mg, según corresponda.

25 Las moléculas de anticuerpo de la presente

invención también pueden usarse en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y la formación de imágenes de estados de enfermedad que implican el TNF.

Como los anticuerpos de la presente invención que
5 son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una
afección patológica, la presente invención también
proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que
comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención
en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o
10 portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se
proporciona el uso de una molécula de anticuerpo de la
invención para la fabricación de un medicamento. La
composición se suministrará habitualmente como parte de una
composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un
15 portador farmacéuticamente aceptable. Una composición
farmacéutica de la presente invención puede comprender
adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un
proceso para la preparación de una composición farmacéutica o
20 de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de
anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un
excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único
ingrediente activo en la composición farmacéutica o de
25 diagnóstico o puede estar acompañada por otros ingredientes

activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos o ingredientes que no son anticuerpos tales como esteroides u otras moléculas de fármacos, en particular moléculas de fármacos cuya semivida es independiente de la unión de TNF.

5 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico
10 necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección que se tiene como objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en
15 modelos de animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la ruta de administración. La información se puede usar para determinar las dosis y rutas útiles para la
20 administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de
25 administración, la(s) combinación(es) de fármacos,

sensibilidades de la reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación de rutina y está dentro del criterio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva
5 será de 0.01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo de 0.1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como de 100 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la
10 invención por dosis.

Las dosis terapéuticas de los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción no muestran efectos de toxicología aparentes *in vivo*.

Las composiciones se pueden administrar
15 individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (por ejemplo simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

Los agentes como se emplean aquí se refieren a una entidad que cuando se administra tiene un efecto fisiológico.

20 El fármaco como se emplea en la presente descripción se refiere a una entidad química que a una dosis terapéutica tiene un efecto fisiológico apropiado.

En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente descripción se emplean con una
25 terapia inmunosupresora, tal como un esteroide, en particular

prednisona.

En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente descripción se emplean con Rituximab u otras terapias de células B.

5 En una modalidad, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente descripción se emplean con cualquier agente modulador o inmunomodulador de células B o células T. Los ejemplos incluyen metotrexato, microfenilato y azatioprina.

10 La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección que se va a tratar, la extensión de la inflamación presente y de que si la molécula de anticuerpo se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.

15 La frecuencia de dosificación dependerá de la semivida del anticuerpo, su disposición mediada por el objetivo, la duración de su efecto, y la presencia de anticuerpos de anti-fármacos. Si el anticuerpo tiene una semivida corta (unas pocas horas) o una actividad limitada,
20 y/o si es deseable administrar pequeños volúmenes del fármaco (por ejemplo, para inyección subcutánea), puede ser necesario administrar dosis con frecuencia, con la misma frecuencia, tan frecuentemente como una vez o más por día. Alternativamente, si el anticuerpo tiene una semivida
25 prolongada, tiene una larga duración de actividad, o puede

dosificarse en grandes volúmenes (por ejemplo, mediante infusión), la dosificación puede ser poco frecuente, una vez al día o cada pocos días, semanas o meses. En una modalidad, se permite suficiente tiempo entre las dosis para permitir
5 que disminuyan los niveles de anticuerpos de anti-fármacos.

La semivida tal como se emplea en la presente descripción está propuesta para referirse a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo en el suero/plasma.

La farmacodinámica tal como se emplea en la
10 presente descripción se refiere al perfil y, en particular, a la duración de la acción biológica de la molécula según la presente descripción.

El portador farmacéuticamente aceptable no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el
15 individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de
20 aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos
25 y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, una solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como
5 agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadoras del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas
10 aguadas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en el bolo o infusión continua. Cuando el producto es para
15 inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un portador aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservadores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en
20 forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo,
25 en una o más modalidades, las composiciones están adaptadas

para la administración a sujetos humanos.

Adecuadamente en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o
5 fragmento, por ejemplo, si el pI de la proteína está en el intervalo de 8-9 o superior, entonces un pH de la formulación de 7 puede ser inapropiado. Aunque no se desea que esté limitado por la teoría, se cree que esto puede finalmente proporcionar una formulación final con estabilidad mejorada,
10 por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

En un ejemplo, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4.0 a 7.0 comprende: 1 a 200 mg/ml de una molécula de anticuerpo según la presente descripción, 1 a 100 mM de una solución amortiguadora, 0.001 a 1% de un agente
15 tensioactivo, a) 10 a 500 mM de un estabilizante, b) 10 a 500 mM de un estabilizador y 5 a 500 mM de un agente para mejorar la tonicidad, o c) 5 a 500 mM de un agente para mejorar la tonicidad.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención
20 pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal,
25 enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Los

"hiposprays" también pueden usarse para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como sustancias inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También
5 se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en portadores líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se
10 administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la
15 composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar mediante una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo contra
20 la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Una descripción completa de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

25 En una modalidad, la formulación se proporciona

como una formulación para administraciones tópicas que incluye la inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables según la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente de las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan de manera adecuada los mono o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente, en la forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo, de 1 a 5 μg . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de importancia primaria.

Los gases propulsores que pueden usarse para

preparar los aerosoles inhalables ya son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente pueden usarse solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados, son particularmente adecuados el TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

Los aerosoles inhalables que contienen el gas propulsor también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizadores, agentes activos superficialmente (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes ya son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen un gas propulsor de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de la sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, de 0.002 a 5% en peso, de 0.01 a 3% en peso, de 0.015 a 2% en peso, de 0.1 a 2% en peso, de 0.5 a 2% en peso o de 0.5 a 1% en peso del

ingrediente activo.

Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante administración de una solución líquida o formulación en suspensión, por ejemplo, 5 empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus (R) conectado a un compresor Pari Master (R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

10 El anticuerpo de la invención puede administrarse dispersado en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. El mismo se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, una solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una 15 solución amortiguada. Los ejemplos de soluciones amortiguadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0.45 mg a 0.55 mg de citrato sódico por 1 ml de 20 agua para alcanzar un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los 25 excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen

soluciones amortiguadoras (por ejemplo, una solución amortiguadora de citrato, una solución amortiguadora de fosfato, una solución amortiguadora de acetato y una solución amortiguadora de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo la albúmina del suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución amortiguadora utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución del disolvente amortiguado estéril y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares para los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable según la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) empaquetadas en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, del disolvente/solución amortiguadora.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser adecuados para la administración por nebulización.

También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de terapia génica. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula del anticuerpo
5 bajo el control de los componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de manera que las cadenas del anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

TNF α es el miembro arquetípico de la superfamilia
10 de TNF. TNF α es una citocina pleiotrópica que tiene un papel mediador en la regulación inmunológica y las respuestas inflamatorias. *In vivo*, también se sabe que TNF α está implicado en respuestas a infecciones bacterianas, parasitarias y virales. En particular, se sabe que TNF α tiene
15 un papel en la artritis reumatoide (RA), enfermedades inflamatorias del intestino (incluida la enfermedad de Crohn), psoriasis, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), dolor, epilepsia, osteoporosis, asma, sepsis, fiebre, lupus eritematoso sistémico (SLE) y
20 esclerosis múltiple (EM) y cáncer. También se sabe que TNF α tiene un papel en la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), accidente cerebrovascular isquémico, glomerulonefritis mediada por complejos inmunitarios, nefritis por lupus (LN), glomerulonefritis asociada a los anticuerpos citoplásmicos
25 antineutrófilos (ANCA), enfermedad por cambios mínimos,

nefropatía diabética (DN), lesión renal aguda (AKI), uropatía obstructiva, rechazo de aloinjerto de riñón, AKI inducida por cisplatino y uropatía obstructiva.

Por consiguiente, se puede usar un anticuerpo o
5 composición de la presente invención (directa o indirectamente) para tratar, prevenir o mejorar cualquier condición que pueda ser tratada, prevenida o mejorada por otros antagonistas de $\text{TNF}\alpha$.

Los anticuerpos y las composiciones de la presente
10 invención son en consecuencia beneficiosos en el tratamiento y/o prevención de diversas dolencias humanas. Estos incluyen los trastornos autoinmunes e inflamatorios; los trastornos neurológicos y neurodegenerativos; el dolor y los trastornos nociceptivos; y los trastornos cardiovasculares.

15 Los trastornos inflamatorios y autoinmunes incluyen los trastornos autoinmunes sistémicos, trastornos endocrinos autoinmunes y trastornos autoinmunes específicos de órganos. Los trastornos autoinmunes sistémicos incluyen lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis, vasculitis,
20 polimiositis, esclerodermia, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren. Los trastornos endocrinos autoinmunes incluyen tiroiditis. Los trastornos autoinmunes específicos de órganos incluyen la enfermedad de Addison, la anemia hemolítica o
25 perniciosa, glomerulonefritis (incluido el síndrome de

Goodpasture), enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes mellitus insulínica, diabetes juvenil, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino (incluida la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa),
5 pénfigo, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, neumonitis autoinmune, carditis autoinmune, miastenia grave, infertilidad espontánea, osteoporosis, asma y distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne).

10 Los trastornos neurológicos y neurodegenerativos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, el accidente cerebrovascular, la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión de la médula espinal, el traumatismo craneal, las
15 convulsiones y la epilepsia.

Los trastornos cardiovasculares incluyen trombosis, hipertrofia cardíaca, hipertensión, contractilidad irregular del corazón (por ejemplo, durante la insuficiencia cardíaca) y trastornos sexuales (incluida la disfunción eréctil y la
20 disfunción sexual femenina).

En particular, un anticuerpo de las composiciones de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir trastornos inflamatorios, trastornos del SNC, trastornos inmunes y enfermedades autoinmunes, dolor, osteoporosis,
25 fiebre y rechazo de trasplantes de órganos. En una modalidad

preferida, un anticuerpo o composición de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino (incluida la enfermedad de Crohn), psoriasis, enfermedad de

5 Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, asma, sepsis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, asma, rinitis, cáncer y osteoporosis. En otra modalidad preferida, un anticuerpo o composición de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir la artritis reumatoide (RA), la

10 artritis inflamatoria no específica, la enfermedad ósea erosiva, la condritis, la degeneración y/o destrucción del cartílago, la artritis inflamatoria juvenil, la enfermedad de Still (juvenil y/o de adulto), artritis idiopática juvenil, artritis idiopática juvenil (formas tanto oligoarticulares

15 como poliarticulares), enfermedades inflamatorias del intestino (incluida la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, colitis indeterminada, reservoritis), psoriasis, artropatía psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sjogren, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de

20 Behcet, enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), accidente cerebrovascular isquémico, dolor, epilepsia, osteoporosis, osteopenia, anemia por enfermedad crónica, caquexia, diabetes, dislipidemia, síndrome metabólico, asma, enfermedad obstructiva crónica de

25 las vías respiratorias (o pulmonar), sepsis, fiebre, síndrome

de dificultad respiratoria, lupus sistémico eritematoso (SLE), glomerulonefritis mediada por complejos inmunes de la esclerosis múltiple (MS), nefritis por lupus (LN), glomerulonefritis asociada a los anticuerpos citoplásmicos antineutrofílicos (ANCA), enfermedad de cambios mínimos, 5 nefropatía diabética (DN), lesión renal aguda (AKI), uropatía obstructiva, rechazo de aloinjerto renal, AKI inducida por cisplatino y uropatía obstructiva, enfermedades oculares (incluida la retinopatía diabética, edema macular diabético, 10 retinopatía de inicio en la etapa prematura, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinopatía proliferativa y/o no proliferativa, vascularización corneal que incluye neovascularización, oclusión de la vena retiniana, diversas formas de uveítis y queratitis), 15 tiroiditis, trastornos fibrosantes que incluyen diversas formas de fibrosis hepática, diversas formas de fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica, esclerodermia, cáncer y complicaciones asociadas al cáncer (incluidas las complicaciones del esqueleto, la caquexia y la anemia).

20 Los anticuerpos y los fragmentos de acuerdo con la presente descripción se pueden emplear en el tratamiento o la profilaxis.

La presente invención también proporciona un método para reducir la concentración de anticuerpos indeseados en un 25 individuo que comprende las etapas de administrar a un

individuo una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TNF o de un fragmento de unión del mismo descrito en este documento.

La presente invención proporciona además el uso de
5 una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico descrito en la presente descripción tal como una enfermedad autoinmune.

En una modalidad, la presente descripción comprende el
10 uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos como un reactivo para diagnóstico, por ejemplo, conjugados con una molécula informadora. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la descripción que está marcado. En un aspecto, se proporciona una columna que comprende un anticuerpo
15 o fragmento de acuerdo con la descripción.

Que comprende en el contexto de la presente descripción está propuesto para que signifique que incluye.

En donde sea técnicamente apropiado, se pueden combinar las modalidades de la invención.

20 Las modalidades se describen en la presente descripción como unas que comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a modalidades separadas que consisten o consisten esencialmente de las características/elementos.

25 Las referencias técnicas tales como las de las

patentes y solicitudes se incorporan aquí como referencia.

La presente invención se describe adicionalmente a manera de ilustración solo en los siguientes ejemplos, que se refieren a las figuras adjuntas, en los cuales.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de regiones variables de TNF-alfa antihumano neutralizantes:

Las siguientes inmunizaciones se realizaron con el fin de generar un material para cultivo de las células B y la
10 detección de anticuerpos:

Se inmunizaron 5 ratas de Sprague Dawley con 3 disparos de TNF-alfa humano formado previamente como un complejo con un compuesto de bencimidazol de molécula pequeña, Compuesto 1 (como se describe en WO2013/186229 y
15 PCT/EP2015/074527). Los sueros se generaron y analizaron para determinar la unión al TNF-alfa humano en un ELISA. Las concentraciones se pudieron medir más allá de una dilución de 100,000 y, por lo tanto, se consideraron aceptables para el cultivo de células B.

20 Los cultivos de células B se prepararon usando un método similar al descrito por Zubler et al. (1985) y Lightwood et al. (2013). Brevemente, se cultivaron esplenocitos que contenían células B, a una densidad de aproximadamente 5000 células por cavidad en placas de cultivo
25 del tejido de 96 cavidades codificadas en barras con 200

ul/cavidad del medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con FCS al 10% (PAA laboratories ltd), 2% de HEPES (Sigma Aldrich), 1% de L-Glutamina (Gibco BRL), 1% de solución de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL), 0.1% de β -
5 mercaptoetanol (Gibco BRL), 2-5% del sobrenadante del cultivo de esplenocitos activados y células de timoma de murino irradiadas con rayos gamma (5×10^4 /cavidad) durante siete días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Más de 70 millones de células B fueron evaluadas durante este proyecto.

10 La presencia de anticuerpos específicos de TNF humanos en los sobrenadantes de cultivo de las células B se determinó usando un ensayo de unión basado en la fluorescencia homogénea utilizando perlas de polímero de superavidina de 10 micras (Bangs Laboratories) recubiertas
15 con TNF humano biotinilado como fuente del antígeno objetivo. Se transfirieron 10 μ l del sobrenadante a placas de cultivo del tjido de 96 cavidades con código de barras en placas de ensayo con paredes negras de 384 cavidades con código de barras que contuvieron 5000 perlas revestidas usando un
20 manipulador de líquidos Matrix Platemate. La unión se reveló con un conjugado de Cy-5 de cabra anti-rata o IgG de ratón específico para Fc γ (Jackson). Las placas se leyeron en un sistema de detección celular de Applied Biosystems 8200.

Alternativamente, se usaron ensayos de ELISA para
25 identificar cavidades positivas. Se recubrieron placas de

ELISA de 384 cavidades con 2 µg/ml de TNF antes de añadir 10 µl del sobrenadante de cultivo de las células B a la placa bloqueada. Después de la incubación durante 1 hora, las placas se lavaron y se reveló la unión con un conjugado de HRP específico para Fc de anti-rata de cabra (Jackson).

Tras la selección primaria, los sobrenadantes positivos se consolidaron en placas maestras con codificación de barras de 96 cavidades utilizando un robot de selección de casos exitosos Aviso Onyx y células B en placas de cultivo de las células congeladas a -80 °C. Las placas maestras se seleccionaron luego en un ensayo Biacore para identificar las cavidades que contuvieron anticuerpos de alta afinidad.

Con el fin de identificar anticuerpos capaces de neutralizar la actividad biológica de TNF α , se realizó un ensayo del indicador de TNF α basado en células usando los sobrenadantes de cultivo de las células B en placas maestras. El ensayo utilizó células HEK-293-CD40-BLUE (Invivogen) que están diseñadas para secretar fosfatasa alcalina en respuesta a una serie de estímulos que operan a través de la vía NF κ B que incluyen el TNF α humano. Los sobrenadantes que contuvieron anticuerpos se usaron directamente en este ensayo a una dilución única de 1:2.5. Las cavidades que contienen anticuerpos de bloqueo de alta afinidad (sub 100 pM en Biacore y que muestran una inhibición > 90% en el ensayo informador) se seleccionaron para una progresión adicional.

Para permitir la recuperación de los genes de la región variable del anticuerpo a partir de una selección de cavidades de interés, se tuvo que realizar una etapa de deconvolución para permitir la identificación de las células B específicas del antígeno en una cavidad dada que contuvo una población heterogénea de células B. Esto se logró utilizando el método de focos fluorescentes. Brevemente, se mezclaron células B secretoras de inmunoglobulina de una cavidad positivo con perlas de estreptavidina (New England Biolabs) recubiertas con TNF humano biotinilado y una disolución final 1:1200 de un conjugado de FITC específico de fragmento Fc γ anti-rata de cabra (Jackson). Después de la incubación estática a 37 °C durante 1 hora, se pudieron identificar células B específicas de antígeno debido a la presencia de un halo fluorescente que rodea esta célula B. Estas células B individuales, identificadas usando un microscopio Olympus, se recogieron luego con un micromanipulador Eppendorf y se depositaron en un tubo de PCR.

Los genes de la región variable del anticuerpo para cuatro anticuerpos diferentes conocidos como 2102, 2101, 2109 y 2111 se recuperaron de células individuales mediante PCR de transcripción inversa (RT)-PCR usando cebadores específicos de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR en un robot de manejo de

líquidos Aviso Onyx, con la 2/a. PCR acoplada que incorpora sitios de restricción en los extremos 3' y 5' que permiten la clonación de la región variable de rata en un vector de expresión de mamífero kappa (VL) de ratón o Fab (VH) o IgG de ratón. Las construcciones de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK-293 usando Fectin 293 (Invitrogen) y el anticuerpo recombinante expresado en placas de 48 cavidades en un volumen de 1 ml. Después de 5-7 días de expresión, los sobrenadantes se recogieron y el anticuerpo se sometió a una selección adicional.

Las moléculas de IgG y Fab quiméricas de rata/ratón recombinantes se seleccionaron en el ensayo informador de HEK-293-CD40-BLUE en una serie de concentraciones para permitir el cálculo de los valores de EC50 y determinar el porcentaje máximo de inhibición. Se probaron fragmentos de Fab para asegurar que el anticuerpo estuvo activo cuando fue monovalente. El IgG también se analizó en un experimento Biacore para determinar las afinidades de unión para TNF humano. El formato de ensayo del experimento Biacore fue la captura de la IgG de ratón por IgG-Fc de anti-ratón inmovilizado y luego la titulación de TNF humano sobre la superficie capturada. Se realizó BIA (análisis de interacción biomolecular) con un aparato Biacore T200 (GE Healthcare). El fragmento F(ab')₂ de Affinipure, un fragmento de Fc, de IgG de anti-ratón de cabra, específico (Jackson ImmunoResearch)

se inmovilizó en un Chip Sensor CM5 a través de la química de unión de la amina a un nivel de ~5000 unidades de respuesta (RU). Se usó una solución amortiguadora de HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0.05% de agente

5 tensioactivo P20, GE Healthcare) como la solución amortiguadora de ejecución con un caudal de 10 μ l/min. Se usó una inyección de 10 μ l de IgG de ratón a 0.5 μ g/ml para la captura por el IgG-Fc de anti-ratón inmovilizado. Se inyectó TNF humano sobre la IgG de ratón capturada dos veces a 20 nM

10 a un caudal de 30 μ l/min. La superficie se regeneró mediante una inyección de 2 x 10 μ l de HCl 40 mM, intercalada por 5 μ l de una inyección de 5 nM de NaOH a una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Las curvas de unión con sustracción del fondo se analizaron usando el software T200evaluation (versión 1.0)

15 siguiendo los procedimientos estándares.

Tabla 4

Anticuerpo	EC50 (ng/ml)	% de inhibición	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
CA2109 IgG	0.31	100	4.70E+06	1.19E-04	25
CA2109 Fab	3.8	100	ND	Nd	ND

20 La neutralización se determinó usando el ensayo informador de HEK-293-CD40-BLUE (Invivogen). La EC50 y el % de neutralización son mostradas. El análisis de Biacore se realizó para determinar la cinética de unión. Se muestran la velocidad (ka), la caída de la velocidad (kd) y la constante

25 de afinidad (KD).

Las Figuras 2a y 2b muestran las curvas de titulación para Fab CA2109 de rata/ratón (fwk18 FAB) de IgG1 (fwk18 IgG). Los datos se determinaron usando el ensayo indicador de HEK-293-CD40-BLUE (Invivogen) como se describió
5 anteriormente.

Los cuatro anticuerpos (2101, 2109, 2111 y 2102) aislados como se describió anteriormente se seleccionaron como Fab quiméricos de rata/humano para la reactividad cruzada de TNF de cinomolgus y humano en TNF humano (hTNF) y TNF de cinomolgus
10 (cTNF) como se muestra en la tabla 4a a continuación.

El formato del ensayo del experimento Biacore fue la captura de los Fab quiméricos de rata/humano por F(ab') antihumano inmovilizado, luego la titulación de TNF humano o de cinomolgus sobre la superficie capturada. Se realizó un
15 BIA (análisis de interacción biomolecular) con un aparato Biacore T200 (GE Healthcare). El fragmento F(ab')₂ de Affinipure, un fragmento de IgG-F(ab')₂ anti-humano de cabra, específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un Chip Sensor CM5 a través de la química de unión de la
20 amina a un nivel de ~5000 unidades de respuesta (RU). Se usó una solución amortiguadora de HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0.05% de agente tensioactivo P20, GE Healthcare) como la solución amortiguadora de ejecución con un caudal de 10 µl/min. Se usó una inyección de
25 10 µl de un agente quimérico de rata/ser humano a 0.5 µg/ml

para la captura por el IgG-F(ab')₂ humano inmovilizado. Se inyectó TNF humano o de cinomolgus sobre el Fab quimérico de rata/ser humano capturado a (5 nM o 3.125 nM respectivamente) a un caudal de 30 µl/min. La superficie se regeneró mediante una inyección de 2 x 10 µl de HCl 50 mM, intercalada por una inyección de 5 µl de NaOH 5 mM a una tasa de flujo de 10 µl/min. Las curvas de unión de sustracción de la línea base se analizaron usando el software T200evaluation (versión 1.0) siguiendo los procedimientos estándares.

Tabla 4a:

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	KD (pM)
02101	Fab humano Quimérico	hTNF	4.63E+06	1.39E-04	2.99E-11	30
02109	Fab humano Quimérico	hTNF	4.09E+06	1.43E-04	3.49E-11	35
02111	Fab humano Quimérico	hTNF	2.89E+06	1.39E-04	4.81E-11	48
02102	Fab humano Quimérico	hTNF	2.59E+06	2.27E-04	8.73E-11	87
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	KD (pM)
02101	Fab humano Quimérico	cTNF	4.54E+06	9.72E-05	2.14E-11	21
02109	Fab humano Quimérico	cTNF	3.71E+06	1.02E-04	2.74E-11	27
02111	Fab humano Quimérico	cTNF	2.26E+06	2.25E-04	9.98E-11	100
02102	Fab humano Quimérico	cTNF	4.17E+05	8.64E-03	2.07E-08	20720

Se encontró que el anticuerpo 2102 tuvo una afinidad mucho menor por el TNF de cinomolgus. Este anticuerpo también perdió afinidad durante la humanización por lo que no se avanzó más.

5 En base a este trabajo, CA2109 se seleccionó como un candidato principal debido a su reactividad cruzada de cinomolgus/humana (tabla 4a), alta afinidad (tabla 4) y potente actividad de neutralización (figuras 2a y 2b y tabla 4). Este anticuerpo se seleccionó para humanización en base a
10 estas propiedades.

Otros dos anticuerpos que tienen propiedades de afinidad y neutralización similares se seleccionaron para la humanización en paralelo a CA2109, estos fueron 2101 y 2111. Sin embargo, 2101 no logró retener la afinidad por TNF después de la
15 humanización, por lo que este anticuerpo no avanzó más. El anticuerpo 2109 y el anticuerpo 2111 se humanizaron con éxito y luego se convirtieron en un formato scFv y se seleccionaron en un ensayo de inhibición de TNF L929 (ensayo descrito a continuación) para confirmar la actividad de neutralización (tabla 5).

20 **Tabla 5**

Anticuerpo	IC50 (pM)
CA2111 Fab	12.49
CA2111 VH1 HLds scFv	135.09
CA2111 VH1 LHds scFv	143.24
CA2109 VH3 scFv	16.55

25

La línea celular L929 es una línea celular de fibrosarcoma de murino que es sensible a los efectos citotóxicos del TNF- α . El TNF estimula a través de los receptores de TNF, que se unen a TNF α del ser humano, de cinomolgus o de murino, para inducir la apoptosis. Las células son co-tratadas con actinomicina D que aumenta la susceptibilidad a la muerte por TNF- α . La viabilidad de las células L929 después del tratamiento con Actinomicina-D/TNF- α y cada anticuerpo de anti-TNF se determinó mediante la detección de los niveles de ATP (que disminuye con la viabilidad decreciente) a través de una reacción de luciferasa (CellTiter-Glo, Promega).

Las células L929 se trataron con 2.35 μ g/ml de actinomicina D y TNF alfa humano a 100 pg/ml en la presencia de cada anticuerpo o compuesto de control en un volumen final de 30 μ l en una placa de fondo plano de 384 cavidades, después de una preincubación de 1 hora. Después de 24 horas a 37 °C, se midió la viabilidad celular del 5% de CO₂ por CellTiter-Glo (Promega Ltd).

Como puede verse en la tabla 5, el anticuerpo 2111 no retuvo la actividad en este ensayo como un scFv (comparado con el Fab humanizado) en la orientación de la cadena pesada-ligera (HL) o de la cadena ligera-pesada (LH). Solo el anticuerpo 2109 retuvo la reactividad cruzada de cinomolgus-humana, la alta afinidad y la capacidad de neutralización y

la termoestabilidad como un scFv humanizado. La humanización del anticuerpo CA2109 se describe con más detalle a continuación.

Ejemplo 2: Humanización del anticuerpo CA2109 de anti-TNF- 5 alfa

El anticuerpo CA2109 se humanizó injertando las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en las estructuras germinales humanas. Las alineaciones de la secuencia del anticuerpo de la rata (donador) con las
10 estructuras de la línea germinal humana (aceptor) se muestran en las figuras 3 y 4, junto con las secuencias humanizadas diseñadas.

La secuencia del aceptor de la línea germinal de la cadena ligera elegida fue la región VK1 2-1(U) A20 VK más la
15 región JK2 J humana (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). La secuencia aceptora de la línea germinal de la cadena pesada elegida fue la región VH3 1-3 3-21 V humana más la región JH4 J (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). Las CDR injertadas del donador a la
20 secuencia aceptora son como las define Kabat (Kabat et al., 1987), con la excepción de CDR-H1, en donde se usa la definición combinada de Chothia/Kabat.

Los genes que codifican las secuencias iniciales de la región V se diseñaron y construyeron mediante un
25 método de síntesis automatizado por Entelechon GmbH, y se

modificaron para generar las versiones injertadas gL1, gL18, gH1 y gH2 mediante mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos. La secuencia del gen gL18 se subclonó en el vector de expresión pMhCK delta de la cadena ligera humana de UCB Celltech, que contiene el ADN que codifica la
5 región constante C-Kappa humana (alotipo Km3). La secuencia de gH2 se subclonó en el vector de expresión pMhglFab de UCB Celltech, que contiene el ADN que codifica la región constante de CH1 gamma-1 de la cadena pesada humana.

10 Para retener una actividad completa y mantener una termoestabilidad elevada, los residuos del donador en las posiciones 48 (isoleucina), 49 (glicina), 71 (valina), 73 (lisina), 78 (alanina) y 93 (treonina) de la cadena pesada humanizada (Numeración de Kabat) fueron retenidos.
15 De forma similar, se conservaron los residuos del donador en las posiciones 65 (treonina), 71 (tirosina) y 87 (fenilalanina) de la cadena ligera humanizada (numeración de Kabat). Además, se eliminaron 3 sitios de desamidación en la cadena ligera mutando los residuos de asparagina en
20 las posiciones 31, 50 y 52 a serina, ácido aspártico y serina, respectivamente. Las secuencias de injerto variables finales seleccionadas gL18 y gH2 se muestran en las figuras 1, 3 y 4, SEC ID NO: 11 y 12.

 Como se describió anteriormente en el ejemplo 1,
25 solo el anticuerpo 2109 retuvo la reactividad cruzada de

cinomolgus-humana, la alta afinidad y la capacidad de neutralización y la termoestabilidad como un scFv humanizado. La capacidad del anticuerpo 2109 para ser igualmente activa en múltiples formatos de anticuerpos que incluyen IgG, Fab y scFv hace que este sea un anticuerpo útil y versátil que puede usarse solo como un anticuerpo monoespecífico o incorporarse en formatos de anticuerpos multiespecíficos.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.