



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2009 00821**

(22) Data de depozit: **10.02.1997**

(30) Prioritate:

09.02.1996 US 08/599, 226
25.11.1966 US 60/031, 476

(41) Data publicării cererii:

30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(62) Divizată din cererea:

Nr. **a 2005 00050**

(71) Solicitant:

• **ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD.,**
CLARENDON HOUSE, 2 CHURCH
STREET, HAMILTON, BM

(72) Inventatori:

• **SAKORAFAS PAUL, 6114 ARBOR DRIVE,**
SHREWSBURY, MA, US;

• **HOOGENBOOM HENDRICUS R.J.M.,**
MUGGENSTRAAT 45 BUS 12, HASSELT,
BE;

• **SCHOENHAUT DAVID, 55 EAST NINTH**
STREET, CLIFTON, NJ, US;

• **VAUGHAN TRISTAN J., 9 VILLA ROAD,**
IMPINGTON, CAMBRIDGE, GB;

• **WHITE MICHAEL, 30 ANGELICA DRIVE,**
FRAMINGHAM, MA, US;

• **WILTON ALISON J., 46 HUNTINGDON**
ROAD, CAMBRIDGE, GB

(74) Mandatar:

CABINET ENPORA S.R.L.,
STR. GEORGE CĂLINESCU NR. 52A,
AP. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) **ANTICORPI UMANI CARE LEAGĂ TNF ALPHA UMAN**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la utilizarea unui anticorp uman izolat, sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, care disociază din TNF α uman, la fabricarea unui medicament pentru tratamentul unei tulburări în care activitatea TNF α este nocivă, în care anticorpul

se administrează în combinație cu cel puțin un agent suplimentar unui subiect, astfel încât se inhibă activitatea TNF α uman.

Revendicări: 59



112

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>2009/0229</u>
Data depozit <u>10.02.1997</u>

ANTICORPI UMANI CARE SE LEAGĂ LA TNF α UMAN

Factorul α al necrozei tumorii (TNF α) este o citokină produsă de numeroase tipuri de celule, incluzând monocite și macrofage, care a fost identificată inițial pe baza capacității sale de a induce necroza anumitor tumori la șoarece (vezi, de exemplu, Old, L. (1985) *Science*, 230:630-632). Ulterior, un factor denumit cașectină, asociat cu cașexia, s-a dovedit a fi aceeași moleculă ca TNF α . TNF α a fost implicat în medierea șocului (vezi, de exemplu, Beutler, B. și Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518; Beutler, B. și Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655). Mai mult, TNF α a fost implicat în patofiziologia a diverse alte boli și tulburări, incluzând sepsie, infecții, bolii autoimune, respingerea transplantului și boala gazdei față de grefă (vezi, de exemplu, Moeller, A. et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; brevet SUA 5.231.024 pentru Moeller et al.; publicația brevetului european 260.610 B1 de Moller, A. et al. Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K.J. și Cerami, A (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503).

Datorită rolului dăunător al TNF α uman (hTNF α) într-o diversitate de tulburări umane s-au desemnat strategii terapeutice pentru a inhiba sau contracara activitatea hTNF α . În special, anticorpi care se leagă la, și neutralizează hTNF α au fost văzuți ca un mijloc de a inhiba activitatea hTNF α . Unii din primii astfel de anticorpi au fost anticorpi monoclonali de șoarece (mAb), secretați de hibridomi preparați de la limfocite de șoareci imunizați cu hTNF α (vezi, de exemplu, Hahn T. et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3814-3818; Liang, C-M., et al., (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:847-854; Hirai, M., et al., (1987) *J. Immunol. Methods* 96:57-62; Fendly., B.M., et al. (1987) *Hybridoma* 6:359-370; Moeller, A., et al., (1990)



Cytokine 2:162-169; brevet SUA 5.231.024 pentru Moeller et al., publicația brevetului european 186.833 B1 de Wallach, D.; publicația cererii de brevet european 218.868 A1 de Old et al.; publicația brevetului european 260.610 B1 de Moeller, A., et al.). În timp ce acești anticorpi de șoarece anti-hTNF α prezintă adesea afinitate crescută pentru hTNF α (de exemplu, $K_d < 10^{-9}$ M) și au fost capabili să neutralizeze activitatea hTNF α , utilizarea lor *in vivo* poate fi limitată de probleme asociate cu administrarea anticorpilor de șoarece la oameni, cum ar fi timpul de înjumătățire scurt în ser, o incapacitate de a declanșa anumite funcții efectoare umane și provocarea unui răspuns imun nedorit împotriva anticorpului de șoarece la un om (reacția "anticorp uman anti-șoarece" (HAMA)).

Într-o încercare de a depăși problemele asociate cu folosirea anticorpilor în întregime murini la oameni, anticorpii murini anti-hTNF α au fost prelucrați prin inginerie genetică pentru a deveni mai mult "like-umani". De exemplu, s-au preparat anticorpi himerici în care regiunile variabile ale catenelor anticorpului sunt derivate murin și regiunile constante ale catenelor anticorpului sunt derivate uman (Knight, D.M., et al (1993) *Mol. Immunol.* 30:1443-1453 publicație PCT WO 92/16553 de Daddona, P.E., et al.). Suplimentar, au fost preparați, de asemenea, anticorpi umanizați, în care domeniile hipervariabile ale regiunilor variabile ale anticopului sunt derivate murin, dar restul regiunilor variabile și regiunile constante ale anticorpului sunt derivate uman (publicație PCT WO 92/11383 de Adair, J.R. et al.). Cu toate acestea, deoarece acești anticorpi himerici umanizați păstrează încă unele secvențe murine, ei încă mai provoacă o reacție imună nedorită, reacția umană anticorp anti-himeric (HACA), în special când se administrează perioade prelungite, de exemplu, pentru indicații cronice cum ar fi artrită reumatoidă (vezi, de exemplu, Elliot, M.J., et al. (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., et al., (1994) *Lancet* 344:1105-1110).

Un agent inhibitor preferat hTNF α pentru mAb murin



derivați ai acestora (de exemplu, anticorpi himerici sau umanizați) va fi un anticorp uman în întregime anti-hTNF α , deoarece un astfel de agent nu ar provoca reacția HAMA, chiar dacă se folosește perioade prelungite. Autoanticorpi monoclonali umani împotriva hTNF α s-au preparat folosind tehnici hibridom uman (Boyle, P., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 152:556-568; Boyle, P., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 152:569-581; publicația cererii de brevet european 614.984 A2 de Boyle, et al.). Totuși, acești autoanticorpi monoclonali derivați de la hibridom s-au raportat ca având o afinitate pentru hTNF α care a fost prea scăzută pentru a se calcula prin metode convenționale, au fost incapabili să lege hTNF α solubil și au fost incapabili să neutralizeze citotoxicitatea indusă hTNF α (vezi Boyle, et al, supra). Mai mult, succesul tehnicii hibridomului uman depinde de prezența naturală în sângele periferic uman a limfocitelor care produc autoanticorpi specifici pentru hTNF α . Anumite studii au detectat autoanticorpi în ser pentru hTNF α la subiecți umani (Fomsgaard, A., et al (1989) *Scand.J.Immunol.* 30:219-223; Bendtzen, K., et al.(1990) *Prog.Leukocyte Biol.* 10B:447-452), în timp ce altele nu Leusch,H-G., et al.(1991) *J.Immunol.Methods* 139:145-147).

Alternativa la anticorpii umani anti-hTNF α întâlniți în mod natural vor fi anticorpi recombinanți hTNF α . Au fost descriși anticorpi umani recombinanți care leagă hTNF α cu afinitate relativ scăzută (adică, $K_d \sim 10^{-7}M$) și o rată rapidă a detașării (adică, $K_{off} \sim 10^{-2}sec^{-1}$) (Griffiths, A.D., et al.(1993) *EMBO J.* 12:725-734). Cu toate acestea, datorită cineticilor lor de disociere relativ rapidă, acești anticorpi nu pot fi adecvați pentru utilizare terapeutică. Suplimentar, s-a descris un anti-hTNF α uman recombinant care nu neutralizează activitatea hTNF α , ci mai degrabă intensifică legarea hTNF α la suprafața celulelor și intensifică internalizarea hTNF α (Lidbury, A., et al.(1994) *Biotechnol. Ther.* 5: 27-45; publicația PCT WO 92/03145 de Aston, R. et al.).

În conformitate, anticorpi umani cum ar fi anticorpi umani recombinanți, care leagă hTNF α cu afinitate crescută și cinet



de disociere lentă și care au capacitatea de a neutraliza activitatea hTNF α , inclusiv citotoxicitatea indusă de hTNF α (*in vitro* și *in vivo*) și activarea celulei indusă de hTNF α , sunt încă necesari.

Această invenție asigură anticorpi umani, de preferință, anticorpi umani recombinanți, care se leagă specific la TNF α uman. Anticorpul invenției sunt caracterizați prin legare la hTNF α cu afinitate ridicată și cinetici de disociere lentă și prin neutralizarea activității hTNF α , inclusiv citotoxicitatea indusă de hTNF α (*in vitro* și *in vivo*) și activarea celulară indusă de hTNF α . Anticorpul invenției sunt caracterizați suplimentar prin legare la hTNF α , dar nu și la hTNF β (limfotoxină) și prin a avea capacitatea de a se lega la alți TNF α de la primate și TNF α de la animale care nu sunt primate, în plus față de TNF α uman.

Anticorpul invenției pot fi de lungime întreagă (de exemplu, un anticorp IgG1 sau IgG4) sau pot să cuprindă numai o porțiune de legare antigen (de exemplu, un fragment Fab, F(ab')₂ sau scFv). Anticorpul recombinant cel mai preferat al invenției, denumit D2E7, are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:3 și un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4. De preferință, anticorpul D2E7 are o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2.

Într-o realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, care disociază de la TNF α uman cu o K_d de $1 \times 10^{-8} M$, sau mai mică și o rată constantă K_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, sau mai mică, ambele determinate de suprafața de rezonanță a plasmonului și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard L929 *in vitro* cu un IC_{50} de $1 \times 10^{-7} M$ sau mai mic. Mai preferat, anticorpul uman izolat, sau porțiunea de legare antigen a acestuia disociază de la TNF α uman cu o K_{off} de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mică, sau chiar mai preferat, cu K_{off} de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mică. Mai preferat, anticorpul uman izolat, sau porțiunea



de legare antigen a acestuia, neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard L929 *in vitro* cu un IC₅₀ de 1x10⁻⁸ M sau mai mic, chiar mai preferat, cu un IC₅₀ de 1x10⁻⁹ M sau mai mic și, încă mai preferat, cu un IC₅₀ de 5x10⁻¹⁰ M sau mai mic.

În altă realizare, invenția asigură un anticorp uman sau o porțiune de legare antigen a acestuia, cu următoarele caracteristici:

a) disociază de la TNF α uman cu K_{off} de 1x10⁻³s⁻¹ sau mai mică, cum s-a determinat prin rezonanța suprafeței plasmonului;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența aminoacidă SEQ ID NR:3, sau modificată de la SEQ ID NR:3 printr-o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7, sau 8, sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8, și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4, sau modificată de la SEQ ID NR:4 printr-o singură substituție alanină la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, sau 11, sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, și/sau 12.

Mai preferat, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, disociază de la TNF α uman cu K_{off} de 5x10⁻⁴s⁻¹ sau mai mică. Încă mai preferat, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, disociază de la TNF α uman cu K_{off} de 1x10⁻⁴s⁻¹ sau mai mică.

În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, cu un LCVR având domeniul CDR3 care cuprinde secvența aminoacidă SEQ ID NR:3, sau modificată de la SEQ ID NR:3 printr-o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7, sau 8, și cu un HCVR având un domeniu CDR3 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4, sau modificată de la SEQ ID NR:4 printr-o singură substituție alanină la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, sau 11. Mai preferat, LCVR are în plus un domeniu CDR2 cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:5 și HCVR are în plus un domeniu CDR2 cuprinzând secvența aminoacidă SEQ ID NR:6. Încă mai preferat, LCVR are în plus un domeniu CDR1



cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:7 și HCVR are în plus un domeniu CDR1 cuprinzând secvența aminoacidă SEQ ID NR:8.

În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, cu un LCVR cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:1 și un HCVR cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2. În anumite realizări, anticorpul are o regiune constantă a catenei grele IgG1 sau o regiune constantă a catenei grele IgG4. În încă alte realizări, anticorpul este un fragment Fab, un fragment F(ab')₂ sau un fragment Fv cu o singură catenă.

În încă alte realizări, invenția asigură anticorpi, sau porțiuni de legare antigen ale acestora, cu un LCVR având domeniul CDR3 cuprinzând o secvență aminoacidă selectată din grupul care constă din SEQ ID NR:3, SEQ ID NR:11, SEQ ID NR:12, SEQ ID NR:13, SEQ ID NR:14, SEQ ID NR:15, SEQ ID NR:16, SEQ ID NR:17, SEQ ID NR:18, SEQ ID NR:19, SEQ ID NR:20, SEQ ID NR:21, SEQ ID NR:22, SEQ ID NR:23, SEQ ID NR:24, SEQ ID NR:25, SEQ ID NR:26 sau cu un HCVR având un domeniu CDR3 cuprinzând o secvență aminoacidă selectată din grupul care constă din SEQ ID NR:4, SEQ ID NR:27, SEQ ID NR:28, SEQ ID NR:29, SEQ ID NR:30, SEQ ID NR:31, SEQ ID NR:32, SEQ ID NR:33, SEQ ID NR:34 și SEQ ID NR:35.

În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau porțiune de legare antigen a acestuia, care neutralizează activitatea TNF α uman, dar nu și a TNF β uman (limfotoxină). Într-o realizare preferată, anticorpul uman, sau o porțiune de legare antigen a acestuia neutralizează activitatea TNF α uman, TNF α de la cimpanzeu, și cel puțin un TNF α de la o primată suplimentară selectată din grupul care constă din TNF α de la babuin, TNF α de la sanguin, TNF α de la cynomolgus și TNF α de la rhesus. De asemenea, de preferință, anticorpul neutralizează activitatea TNF α de la cel puțin un animal care nu este primat. De exemplu, într-o subrealizare, anticorpul uman izolat sau porțiunea de legare a acestuia, neutralizează de asemenea, activitatea TNF α canin. Într-o altă subrealizare, anticorpul uman izolat sau porțiunea de legare a acestuia,



neutralizează de asemenea, activitatea TNF α de la porc. În încă altă subrealizare, anticorpul uman izolat sau porțiunea de legare a acestuia, neutralizează de asemenea, activitatea TNF α de la șoarece.

Alt aspect al invenției aparține moleculelor de acid nucleic care codifică anticorpul, sau porțiunile de legare antigen ale invenției. Un acid nucleic preferat al invenției, care codifică un D2E7 LCVR, are secvența nucleotidică prezentată în Figura 7 și SEQ ID NR:36. Alt acid nucleic preferat al invenției, care codifică un D2E7 HCVR, are secvența nucleotidică prezentată în Figura 8 și SEQ ID NR:37. Vectori de expresie recombinanți care conțin acizii nucleici care codifică anticorpul invenției și celule gazdă în care s-au introdus asemenea vectori sunt de asemenea cuprinși în invenție, deoarece sunt metode de obținere a anticorpilor invenției prin cultivarea celulelor gazdă ale invenției.

Încă alt aspect al invenției, aparține la metode pentru inhibarea activității TNF α uman folosind un anticorp, sau o porțiune de legare antigen a acestuia al invenției. Într-o realizare, metoda cuprinde punerea în contact a TNF α uman cu anticorpul invenției, sau porțiunea de legare anticorp a acestuia, astfel încât activitatea TNF α uman este inhibată. În altă realizare, metoda cuprinde administrarea unui anticorp al invenției sau porțiunii de legare antigen a acestuia, la un subiect uman care suferă de o tulburare în care activitatea TNF α este dăunătoare, astfel încât activitatea TNF α uman din subiectul uman este inhibată. Tulburarea poate fi, de exemplu, sepsie, o boală autoimună (de exemplu, artrită reumatoidă, alergie, scleroză multiplă, diabet autoimun, uveită autoimună și sindrom nefrotic), o boală infecțioasă, o malignitate, respingerea transplantului sau boala gazdei față de grefă, o tulburare pulmonară, o tulburare osoasă, o tulburare intestinală, sau o tulburare cardiacă.

În continuare se prezintă pe scurt figurile care însoțesc invenția.



Figurile 1A și 1B arată secvențele aminoacide ale regiunii variabile ale catenei ușoare ale D2E7 (D2E7 VL; de asemenea prezentate în SEQ ID NR:1), mutante alanină-scan ale D2E7 VL (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 și LD2E7*.A8), regiunea variabilă a anticorpului înrudit D2E7, 1SD4 (2SD4 VL; prezentat de asemenea în SEQ ID NR:9) și alte regiuni variabile ale catenei ușoare înrudite D2E7 (EP B12, VL10E4, VL100A9, VL100D2, VL10F4, LOE5, VLLOF9, VLLOF10, VLLOG7, VLLOG9, VLLOH1, VLLOH10, VL1B7, VL1C1, VL1C7, VL0.1F4, VL0.1H8, LOE7, LOE7.A și LOE7.T). Figura 1A prezintă domeniile FR1, CDR1, FR2 și CDR2. Figura 1B arată domeniile FR3, CDR3 și FR4. Domeniile catenei ușoare sunt încercuite CDR1("CDR L1"), CDR2("CDR L2") și CDR3("CDR L3").

Figurile 2A și 2B prezintă secvențele aminoacide ale regiunii variabile ale catenei grele ale D2E7 (D2E7 VH; prezentată de asemenea în SEQ ID NR:2), mutante alanină-scan ale D2E7 VH (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 și HD2E7*.A9), regiunea variabilă a catenei grele a anticorpului înrudit D2E7, 2SD4 (2SD4 VH; de asemenea prezentat în SEQ ID NR:10) și regiuni variabile ale catenei grele înrudite la D2E7 (VH1B11, VH1D8, VH1A11, VH1B12, VH1-D2, VH1E4, VH1F6, VH1G1, 3C-H2, VH1-D2.N și VH1-D2.Y). Figura 2A prezintă domeniile FR1, CDR1, FR2 și CDR2. Figura 2B arată domeniile FR3, CDR3 și FR4. Domeniile catenei grele CDR1("CDR H1"), CDR2("CDR H2"9 și CDR3("CDR H3") sunt încercuite.

Figura 3 este un grafic care ilustrează inhibarea citotoxicității TNF α indusă de L929 prin anticorpul D2E7 anti-TNF α uman, cum s-a comparat la anticorpul murin anti-TNF α , MAK 195.

Figura 4 este un grafic care ilustrează inhibarea legării rhTNF α la receptori hTNF α pe celule U-937 prin anticorpul D2E7 anti-TNF α uman, cum s-a comparat la anticorpul MAK 195 murin anti-hTNF α .

Figura 5 este un grafic care ilustrează inhibarea ELAM-1 indusă TNF α pe HUVEC prin anticorpul uman D2E7 anti-hTNF α , cum s-a comparat la anticorpul murin MAK anti-hTNF α .



Figura 6 este un grafic cu bare care ilustrează protecția de letalitate indusă TNF α la șoareci sensibilizați D-galactozamină prin administrare de anticorp uman D2E7 anti-hTNF α (bare negre), cum s-a comparat la anticorpul murin MAK 195 anti-hTNF α (bare deschise).

Figura 7 arată secvența nucleotidică a regiunii variabile a catenei ușoare a D2E7, cu secvența aminoacidă prezisă sub secvența nucleotidică. Regiunile CDR L1, CDR L2 și CDR L3 sunt subliniate.

Figura 8 prezintă secvența nucleotidică a regiunii variabile a catenei grele a D2E7, cu secvența aminoacidă prezisă sub secvența nucleotidică. Regiunile CDR H1, CDR H2 și CDR H3 sunt subliniate.

Figura 9 este un grafic care ilustrează efectul tratamentului cu anticorp D2E7 asupra mărimii medii a articulației șoarecilor transgenici Tg197 ca un model de poliartrită.

Această invenție aparține anticorpilor umani izolați, sau porțiunilor de legare antigen ale acestora, care se leagă la TNF α uman cu afinitate ridicată, o rată de detașare scăzută și capacitate de neutralizare ridicată. Diverse aspecte ale invenției se referă la anticorpi și fragmente anticorp și compoziții farmaceutice ale acestora, precum acizi nucleici, vectori de expresie recombinanți și celule gazdă pentru a obține astfel de anticorpi și fragmente. Metode de folosire a anticorpilor invenției pentru detectarea TNF α uman sau pentru a inhiba activitatea TNF α uman, fie *in vitro*, fie *in vivo*, sunt de asemenea cuprinse în invenție.

În scopul ca invenția de față să fie înțeleasă cu mai multă ușurință, mai întâi sunt definiți anumiți termeni.

Termenul "TNF α uman" (abreviat aici ca hTNF α , sau simplu, hTNF), așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la o citokină umană care există ca o formă secretată de 17 kD și o formă asociată membranei de 26 kD a cărei formă biologic activă este compusă dintr-un trimer de molecule 17 kD legate necovalent.



Structura hTNF α este descrisă suplimentar în, de exemplu, Pennica, D., et al. (1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J.M., et al. (1988) *Biochemistry* 26:1322-1326; și Jones, E.Y., et al. (1989) *Nature* 338:225-228. Termenul TNF α uman intenționează să includă TNF α uman recombinant (rhTNF α), care se poate prepara prin metode de expresie recombinantă standard sau se poate procura comercial (R&D Systems, Catalog Nr. 210-TA, Minneapolis, MN).

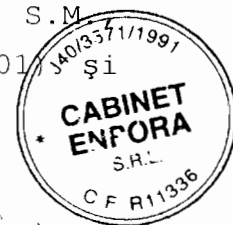
Termenul "anticorp", așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la molecule de imunoglobulină cuprinzând 4 catene polipeptidice, 2 catene grele (H) și două catene ușoare (L) interconectate prin punți disulfură. Fiecare catenă grea cuprinde o regiune variabilă a catenei grele (abreviată aici ca HCVR sau VH) și o regiune constantă a catenei grele. Regiunea constantă a catenei grele cuprinde 3 domenii, CH1, CH2 și CH3. Fiecare catenă ușoară cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (abreviată aici ca LCVR sau VL) și o regiune constantă a catenei ușoare. Regiunea constantă a catenei ușoare cuprinde un domeniu, CL. Regiunile VH și VL pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni care determină complementaritate (CDR), care alternează cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni cadru (FR). Fiecare VH și VL este compus din 3 CDR-uri și 4 FR-uri, aranjate de la terminusul amino spre terminusul carboxi în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Termenul "porțiune de legare antigen" a unui anticorp (sau simplu "porțiune anticorp"), așa cum s-a folosit aici, se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega specific la un antigen (de exemplu, hTNF α). S-a dovedit că funcțiunea de legare antigen a unui anticorp poate fi realizată prin fragmente ale unui anticorp de lungime întreagă. Exemple de fragmente de legare cuprinse în termenul "porțiune de legare antigen" ale unui anticorp includ (i) un fragment Fab, un fragment monovalent, care constă din domeniile VL, VH, CL și CH1; (ii) un fragment F(ab').



fragment bivalent care cuprinde 2 fragmente Fab legate printr-o punte disulfură la regiunea de legătură; (iii) un fragment Fd constând din domeniile VH și CH1; (iv) un fragment Fv constând din domeniile VL și VH ale unui singur braț al unui anticorp; (v) un fragment dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546) care constă dintr-un domeniu VH; și (vi) o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR). Mai mult, deși cele 2 domenii al fragmentului Fv. VL și VH, sunt codate prin gene separate, ele pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic care le face să fie ca o singură catenă de proteină în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute drept catenă unică Fv(scFv); vezi, de exemplu, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; și Huston et al (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). Astfel de anticorpi cu o singură catenă sunt de asemenea intenționați să fie cuprinși în termenul "porțiune de legare antigen" a unui anticorp. Alte forme de anticorpi cu o singură catenă, cum ar fi diacorpii sunt de asemenea cuprinși în invenție. Diacorpii sunt anticorpi bivalenți, bispecifici în care domeniile VH și VL sunt exprimate pe o singură catenă polipeptidică, dar folosind un linker care este prea scurt pentru a permite împerecherea dintre cele 2 domenii pe aceeași catenă, prin aceasta forțând domeniile să se împerecheze cu domeniile complementare ale altei catene și creând 2 situri de legare antigen (vezi, de exemplu, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al (1994) *Structure* 2:1121-1123).

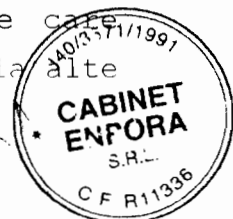
Încă, în plus un anticorp sau porțiune de legare antigen a acestuia poate fi parte a unei molecule de imunoadeziune mai mare, formată prin asociere covalentă sau necovalentă a anticorpului sau porțiunii anticorp cu una sau mai multe alte proteine sau peptide. Exemple de astfel de molecule de imunoadeziune includ folosirea regiunii miez a streptavidinei pentru a obține o moleculă scFv tetramerică (Kipriyanov, S.M. et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) și



folosirea unui rest cisteină, o peptidă marker și o coadă C-terminală polilizină pentru a obține molecule bivalente și biotinilate scFv (Kipriayanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Porțiuni anticorp, cum ar fi fragmente Fab și $F(ab')_2$, se pot prepara de la anticorpi întregi folosind tehnici convenționale, cum ar fi digestie papaină sau respectiv pepsină, a anticorpilor întregi. Mai mult, anticorpi, porțiuni anticorp și molecule de imunoadeziune pot fi obținute folosind tehnici ADN recombinant standard, așa cum s-au descris aici.

Termenul "anticorp uman", așa cum s-a folosit aici, se intenționează să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate de la secvențe ale liniei germinale imunoglobulină. Anticorpii umani ai invenției pot să includă resturi aminoacide care nu sunt codate de secvențele liniei germinale ale imunoglobulinei umane (de exemplu, mutații introduse prin mutagenază randomică sau dirijată în sit *in vitro* sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu, în CDR-uri și în special CDR3. Totuși, termenul "anticorp uman", așa cum s-a folosit aici, nu intenționează să includă anticorpi în care secvențele CDR derivate de la linia germinală a altor specii mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost grefate pe secvențe cadru umane.

Termenul "anticorp recombinant uman", așa cum s-a folosit aici, se intenționează să includă toți anticorpii umani care sunt preparați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii exprimați folosind un vector recombinant transfectat într-o celulă gazdă (descrisă suplimentar în Secțiunea II, de mai jos), anticorpi izolați de la bancă de anticorpi recombinanți, combinatoriali (descrisă în plus în Secțiunea III, de mai jos), anticorpi izolați de la un animal (de exemplu, un șoarece) care este transgenic pentru genele imunoglobulinei umane (vezi, de exemplu, Taylor, L.D., (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) sau anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alte mijloace care implică îmbinarea secvențelor genei imunoglobulinei umane la alte



secvențe ADN. Asemenea anticorpi recombinanți umani au regiuni variabile și constante derivate de la secvențele liniei germinale ale imunoglobulinei umane. În unele realizări, totuși, asemenea anticorpi umani recombinanți sunt supuși la mutageneză *in vitro* (sau, când se folosește un animal transgenic pentru secvențe Ig umane, mutageneză somatică *in vivo*) și astfel secvențele aminoacide ale regiunilor VH și VL ale anticorpilor recombinanți sunt secvențe care, în timp ce sunt derivate de la și înrudite la secvențele liniei germinale VBH și VL, pot să nu existe în mod natural în repertoriul *in vivo* al liniei germinale de anticorpi umani.

Un "anticorp izolat", așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la un anticorp care este în mod substanțial liber de alți anticorpi care au specificități antigenice diferite (de exemplu, un anticorp izolat care se leagă specific la hTNF α este substanțial liber de anticorpi care se leagă antigeni specifici alții decât hTNF α). Un anticorp izolat care se leagă specific la hTNF α poate, cu toate acestea, să aibă reactivitate încrucișată față de alți antigeni, cum ar fi molecule TNF α de la alte specii (discutate în detaliu mai jos). Mai mult, un anticorp izolat poate fi substanțial liber de alt material celular și/sau chimicale.

Un "anticorp de neutralizare", așa cum s-a folosit aici (sau un "anticorp care a neutralizat activitatea hTNF α "), se intenționează să se refere la un anticorp a cărui legare la hTNF α rezultă în inhibarea activității biologice a hTNF α . Această inhibare a activității biologice a hTNF α poate fi cercetată prin măsurarea unuia sau mai multor indicatori ai activității biologice a hTNF α , cum ar fi citotoxicitatea indusă hTNF α (fie *in vitro* sau *in vivo*), activarea celulară hTNF α și legarea hTNF α la receptorii hTNF α . Acești indicatori ai activității biologice a hTNF α pot fi cercetați prin una sau mai multe dintre câteva analize standard *in vitro* sau *in vivo* cunoscute în domeniu (vezi Exemplul 4). De preferință, capacitatea unui anticorp de a neutraliza activitatea hTNF α este cercetată prin inhibarea



citotoxicității induse de hTNF α a celulelor L929. Ca un parametru suplimentar sau alternativ al activității hTNF α , poate fi cercetată capacitatea unui anticorp de a inhiba expresia indusă hTNF α al ELAM-1 pe HUVEC, ca o măsură a activării celulare indusă de hTNF α .

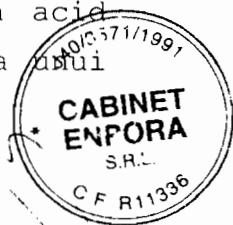
Termenul "rezonanța suprafeței plasmonului", așa cum s-a folosit aici, se referă la un fenomen optic care permite analiza interacțiunilor biospecifice în timp real prin detecția modificărilor în concentrațiile proteice cu o matrice biosenzor, de exemplu, folosind sistemul BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suedia și Piscataway, NJ). Pentru descrieri suplimentare vezi Exemplul 1 și Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; și Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

Termenul " K_{off} ", așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la constanta ratei de detașare pentru disocierea unui anticorp din complexul anticorp/antigen.

Termenul " K_d ", așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la constanta disocierii unei interacțiuni particulare anticorp-antigen.

Termenul "moleculă de acid nucleic", așa cum s-a folosit aici, intenționează să includă molecule ADN și molecule ARN. O moleculă de acid nucleic poate fi cu o singură bandă sau cu 2 benzi, dar de preferință, este ADN cu 2 benzi.

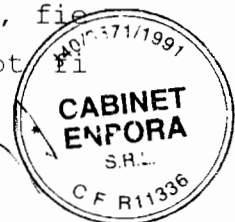
Termenul "moleculă de acid nucleic izolat", așa cum s-a folosit aici cu referire la acizi nucleici care codifică anticorpi sau porțiuni anticorp (de exemplu, VH, VL, CDR3) care leagă hTNF α , intenționează să se refere la o moleculă de acid nucleic în care secvențele nucleotidice care codifică anticorpi sau porțiuni anticorp sunt libere de alte secvențe nucleotidice care codifică anticorpi sau porțiuni anticorp care leagă antigeni alții decât hTNF α , care alte secvențe pot flanca acidul nucleic natural în ADN-ul genomic uman. Astfel, de exemplu, un acid nucleic izolat al invenției care codifică o regiune VH a unui



anticorp anti-TNF α , nu conține alte secvențe care codifică alte regiuni VH care leagă antigeni alții decât TNF α .

Termenul "vector", așa cum s-a folosit aici, intenționează să se refere la o moleculă de acid nucleic capabilă să transporte alt acid nucleic la care a fost legat. Un tip de vector este un "plasmid", care se referă la o buclă de ADN dublu bandă circulară în care pot fi legate segmente de ADN suplimentare. Alt tip de vector este un vector viral, în care segmente de ADN suplimentar pot fi legate în genomul viral. Anumiți vectori sunt capabili de replicare autonomă într-o celulă gazdă în care ei sunt produși (de exemplu, vectori bacterieni având o origine a replicării bacteriene și vectori epizomali mamiferi). Alți vectori (de exemplu, vectori mamiferi non-epizomali) pot fi integrați în genomul unei celule gazdă la introducerea în celula gazdă și prin aceasta sunt replicați împreună cu genomul gazdei. Mai mult, anumiți vectori sunt capabili să dirijeze expresia genelor la care ei sunt legați operațional. Astfel de vectori sunt cunoscuți aici ca "vectori de expresie recombinanți" (sau simplu, "vectori de expresie"). În general, vectori de expresie cu utilitate în tehnicile ADN recombinant sunt adesea sub formă de plasmizi. În prezenta descriere, "plasmid" și "vector" pot fi folosiți interschimbabil, deoarece plasmidul este cea mai comună formă de vector folosit. Cu toate acestea, invenția intenționează să includă astfel de alte forme ale vectorilor de expresie, cum ar fi vectori virali (de exemplu, retrovirusuri deficiente pentru replicare, adenovirusuri și virusuri asociate adeno), care servesc pentru funcțiuni echivalente.

Termenul "celulă gazdă recombinantă" (sau simplu, "celulă gazdă"), așa cum s-a folosit aici, se intenționează să se refere la o celulă în care a fost introdus un vector de expresie recombinant. Se va înțelege că asemenea termeni se intenționează să se refere nu numai la celula subiect particular, ci și la urmașii unei astfel de celule. Deoarece anumite modificări se pot petrece în generațiile în succesiune fie datorită mutațiilor, fie influențelor de mediu, astfel de urmași, de fapt, nu pot fi



identici cu celula parentală, dar sunt încă incluși în cuprinsul termenului "celulă gazdă" cum s-a folosit aici.

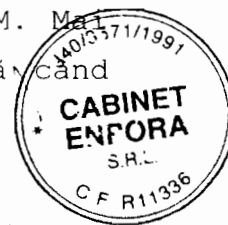
Diverse aspecte ale invenției sunt descrise în continuare în detaliu în subsecțiunile care urmează.

I. Anticorpi umani care leagă TNF α uman

Această invenție asigură anticorpi umani izolați, sau porțiuni de legare antigen ale acestora, care se leagă la TNF α uman cu afinitate crescută, o rată a detașării scăzută și capacitate de neutralizare ridicată. De preferință, anticorpii umani ai invenției sunt anticorpi umani de neutralizare anti-hTNF α , recombinanți. Cel mai preferat anticorp recombinant de neutralizare al invenției este denumit până aici ca D2E7 și are secvențele VL și VH cum s-au prezentat în Figura 1A, 1B și respectiv, Figura 2A, 2B (secvența aminoacidă a regiunii D2E7 VL este de asemenea prezentată în SEQ ID NR:1; secvența aminoacidă a regiunii D2E7 VH este prezentată de asemenea în SEQ ID NR:2). Proprietățile legării D2E7, așa cum s-au comparat la mAb murin MAK 195 anti-hTNF α care prezintă afinitate crescută și cinetici de disociere lentă și alt anticorp uman anti-hTNF α înrudit secvenței D2E7, 2SD4, sunt rezumate mai jos:

Anticorp	K_{off} sec ⁻¹	k_{on} M ⁻¹ sec ⁻¹	K_d M	Stoichiometrie
D2E7 IgG1	$8,81 \times 10^{-5}$	$1,91 \times 10^5$	$6,09 \times 10^{-10}$	1,2
2SD4 IgG4	$8,4 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^5$	$2,00 \times 10^{-8}$	0,8
MAK 195 F(ab') ₂	$8,70 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^5$	$4,60 \times 10^{-10}$	1,4

Anticorpul D2E7 și anticorpi înrudiți prezintă de asemenea o capacitate puternică de a neutraliza activitatea hTNF α , cum s-a cercetat prin câteva analize *in vitro* și *in vivo* (vezi, Exemplul 4). De exemplu, acești anticorpi neutralizează citotoxicitatea indusă hTNF α a celulelor cu valori IC₅₀ în domeniu de aproximativ 10⁻⁷ M la aproximativ 10⁻¹⁰ M. D2E7, când s-a exprimat ca anticorp IgG1 de lungime întreagă, neutralizează citotoxicitatea indusă hTNF α a celulelor L929 cu IC₅₀ de aproximativ 1,25x10⁻¹⁰ M. Mai mult, capacitatea de neutralizare a D2E7 este menținută când



anticorpul se exprimă ca un fragment Fab, $F(ab')_2$ sau scFv. De asemenea, D2E7 inhibă activarea celulară indusă de $TNF\alpha$, așa cum s-a măsurat prin expresia ELAM-1 pe HUVEC indusă de $hTNF\alpha$ (IC_{50} =aproximativ $1,85 \times 10^{-10}$ M) și legarea $hTNF\alpha$ la receptori $hTNF\alpha$ pe celule U-937 (IC_{50} =aproximativ $1,56 \times 10^{-10}$ M). Considerând cele din urmă D2E7 inhibă legarea $hTNF\alpha$ la ambii receptori $hTNF\alpha$ p55 și p75. Mai mult, anticorpul inhibă *in vivo* letalitatea indusă $hTNF\alpha$ la șoareci (ED_{50} =1-2,5 μ g/șoarece).

Considerând specificitatea legării D2E7, acest anticorp se leagă la $TNF\alpha$ uman în diverse forme, incluzând $hTNF\alpha$ solubil, $hTNF\alpha$ transmembranar și $hTNF\alpha$ legat la receptori celulari. D2E7 nu se leagă specific la alte citokine ca limfotocina ($TNF\beta$), IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN γ și TGF β . Totuși, D2E7 prezintă reactivitate încrucișată la factorii necrozei tumorii de la alte specii. De exemplu, anticorpul neutralizează activitatea a cel puțin 5 $TNF\alpha$ de la primate (cimпанzeu, babuin, sanguin, cynomolgus și rhesus) cu valori IC_{50} aproximativ echivalente ca pentru neutralizarea $hTNF\alpha$ (vezi, Exemplul 4, subsecțiunea E). De asemenea, D2E7 neutralizează activitatea $TNF\alpha$ de șoarece, deși de aproximativ 1000 de ori mai puțin decât $TNF\alpha$ uman (vezi, Exemplul 4, subsecțiunea E). De asemenea, D2E7 se leagă la $TNF\alpha$ canin și porcine.

Într-un aspect, invenția aparține la anticorpul D2E7 și porțiuni de anticorp, anticorpi înrudiți D2E7 și porțiuni anticorp și alți anticorpi umani și porțiuni de anticorp cu proprietăți echivalente la D2E7, cum ar fi afinitate de legare ridicată la $hTNF\alpha$ cu cinetici de disociere scăzute și capacitate de neutralizare ridicată. Într-o realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, care disociază de $TNF\alpha$ uman cu K_d de 1×10^{-8} M sau mai puțin și o rată constantă K_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate de suprafața de rezonanță a plasmonului și neutralizează citotoxicitatea $TNF\alpha$ uman într-un test standard L929 *in vitro* cu IC_{50} de 1×10^{-7} sau mai mic. Mai preferat, anticorpul uman izolat, sau porțiunea de legare antigen



acestui disociază de la TNF α uman cu K_{off} de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mică, sau chiar mai preferat, cu K_{off} de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mică. Mai preferat, anticorpul uman izolat sau porțiunea de legare antigen a acestuia, neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard L929 *in vitro* cu IC_{50} de 1×10^{-8} M sau mai puțin, chiar mai preferat, cu IC_{50} de 1×10^{-9} M sau mai puțin și încă mai preferabil, cu IC_{50} de 1×10^{-10} M sau mai puțin. Într-o realizare preferată, anticorpul este un anticorp uman recombinant izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia. În altă realizare preferată, anticorpul neutralizează de asemenea, activarea celulară TNF α , așa cum s-a cercetat folosind o analiză standard *in vitro* pentru expresia ELAM-1 indusă TNF α pe celulele endoteliale din vena ombilicală umană (HUVEC).

Analiza de rezonanță a suprafeței plasmonului pentru determinarea K_d și K_{off} poate fi realizată cum s-a descris în Exemplul 1. Un test standard L929 *in vitro* pentru determinarea valorilor IC_{50} este descris în Exemplul 4, subsecțiunea A. Un test standard *in vitro* pentru expresia ELAM-1 indusă TNF α asupra celulelor endoteliale din vena ombilicală umană (HUVEC) este descris în Exemplul 4, subsecțiunea C. Exemple de anticorpi umani recombinanți care îndeplinesc sau sunt anticipați a îndeplini, criteriile cinetice și de neutralizare menționate mai înainte includ anticorpi având următoarele perechi de secvențe [VH/VL] care sunt prezentate în Figurile 1A, 1B, 2A și 2B (de asemenea vezi, Exemplele 2, 3 și 4 pentru analizele cinetice și de neutralizare): [D2E7 VH/D2E7 VL]; [HD2E7*.A1/D2E7 VL], [HD2E7*.A2/D2E7 VL], [HD2E7 *.A3/D2E7 VL], [HD2E7 *.A4/D2E7 VL], [HD2E7 *.A5/D2E7 VL], [HD2E7 *.A6/D2E7 VL], [HD2E7 *.A7/D2E7 VL], [HD2E7 *.A8/D2E7 VL], [HD2E7 *.A9/D2E7 VL], [D2E7 VH/LD2E7*.A1], [D2E7 VH/LD2E7*.A4], [D2E7 VH/LD2E7*.A5], [D2E7 VH/LD2E7*.A7], [D2E7 VH/LD2E7*.A8], [HD2E7 *.A9/LD2E7*.A1], [VH1-D2/LOE7], [VH1-D2.N/LOE7.T], [VH1-D2.Y/LOE7.A], [VH1-D2.N/LOE7.A], [VH1-D2/EP B127] și [3C-H2/LOE7].

Este bine cunoscut în domeniu că domeniile CDR3 ale catenei grea și ușoară joacă un rol important în specificitatea



afinitatea legării unui anticorp pentru un antigen. În conformitate, un alt aspect, invenția aparține anticorpilor umani care au cinetici de disociere mai mari pentru asociere cu hTNF α și care au domenii CDR3 ale catenei ușoare și grea care structural sunt identice la sau înrudite celor ale D2E7. Așa cum s-a demonstrat în Exemplul 3, poziția 9 a D2E7 VL CDR3 poate fi ocupată de Ala sau Thr cu afectarea substanțială a K_{off} . În conformitate, un motiv consens pentru D2E7 VL CDR3 cuprinde secvența aminoacidă: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NR:3). Suplimentar, poziția 12 a D2E7 VL CDR3 poate fi ocupată de Tyr sau Asn, fără afectarea substanțială a K_{off} . În conformitate, un motiv consens pentru D2E7 VL CDR3 cuprinde secvența aminoacidă: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NR:4). Mai mult, așa cum s-a demonstrat în Exemplul 2, domeniul CDR3 al catenelor grea și ușoară a D2E7 este favorabil pentru substituție cu un singur rest alanină (la poziția 1, 4, 5, 7 sau 8 în VL CDR3 sau la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11 în VH CDR3) fără afectarea substanțială a K_{off} . Încă suplimentar, specialistul în domeniu va aprecia că dat fiind caracterul favorabil al domeniilor D2E7 VL și VH CDR3 pentru substituțiile prin alanină, substituția altor aminoacizi în domeniile CDR3 poate fi posibilă păstrând încă rata de detașare constantă a anticorpului, în special, substituții cu aminoacizi conservativi. O "substituție aminoacidă conservativă", așa cum s-a folosit aici, este una în care restul aminoacid este înlocuit cu alt rest aminoacid având o catenă laterală similară. Familii ale resturilor aminoacide care au catene laterale similare au fost definite în domeniu, incluzând catene laterale bazice (de exemplu, lizină, arginină, histidină), catene laterale acide (de exemplu, acid aspartic, acid glutamic), catene laterale polare neîncărcate (de exemplu, glicină, asparagină, glutamină, serină, treonină, tirozină, cisteină), catene laterale nepolare (de exemplu, alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină, triptofan), catene laterale β -ramificate (de exemplu, treonină, valină, izoleucină) și catene laterale aromatice (de exemplu, tirozină, fenilalanină, triptofan,



histidină). De preferință, nu sunt făcute mai mult de 1 la 5 substituții aminoacide conservative în D2E7 VL și/sau domeniile VH CDR3. Mai preferat, nu sunt făcute mai mult decât 1 la 3 substituții aminoacide conservative în domeniile D2E7 VL și/sau VH CDR3. Suplimentar, substituții aminoacide conservative nu vor fi făcute la poziții aminoacide critice pentru legare la hTNF α . Așa cum s-a arătat în Exemplul 3, pozițiile 2 și 5 ale D2E7 VL CDR3 și pozițiile 1 și 7 ale D2E7 VH CDR3 par a fi critice pentru interacțiune cu hTNF α și astfel, de preferință, substituții aminoacide conservative nu sunt făcute la aceste poziții (deși o substituție alanină la poziția 5 a D2E7 VL CDR3 este acceptabilă, așa cum s-a descris mai sus).

În conformitate, în altă realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau porțiune de legare antigen a acestuia, cu următoarele caracteristici:

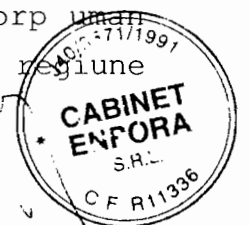
a) disociază de la TNF α uman cu o rată constantă K_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ sau mai mică, cum s-a determinat prin rezonanța suprafeței plasmonului;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:3, sau modificată de la SEQ ID NR:3 printr-o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7, sau 8, sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8, și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4, modificată de la SEQ ID NR:4 printr-o singură substituție alanină la pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11 sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 și/sau 12.

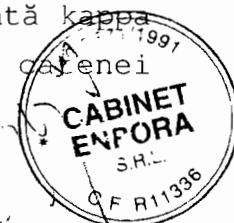
Mai preferabil, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, disociază de la TNF α uman cu un K_{off} de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mic. Chiar mai preferabil, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, disociază de la TNF α uman cu un K_{off} de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ sau mai mic.

În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, cu o regiune



variabilă a catenei ușoare (LCVR) având un domeniu CDR3 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:3, sau modificată de la SEQ ID NR:3 printr-o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7 sau 8, și cu o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) având un domeniu CDR3 cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4, sau modificată de la SEQ ID NR:4 printr-o singură poziție alanină la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11. De preferință, LCVR cuprinde în plus un domeniul CDR2 cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:5 (adică, D2E7 VL CDR2) și HCVR cuprinde în plus un domeniu CDR2 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:6 (adică, D2E7 VH CDR2). Chiar mai preferat, LCVR are în plus un domeniu CDR1 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:7 (adică, D2E7 VL CDR1) și HCVR are un domeniu CDR1 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:8 (adică, D2E7 VH CDR1). Regiunile cadru pentru VL sunt de preferință de la linia germinală umană V_{kI} , mai preferat de la gena V_k a liniei germinale umane A20 și cel mai preferat de la secvențele cadrului D2E7 VL prezentate în Figurile 1A și 1B. Regiunile cadru pentru VH sunt de preferință de la familia germinală umană V_{H3} , mai preferat de la gena VH linia germinală DP-31 și cel mai preferat de la secvențele cadrului D2E7 VH prezentate în Figurile 2A și 2B.

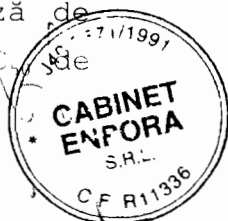
În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau porțiune de legare antigen a acestuia, cu o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) care cuprinde secvența aminoacidă a secvenței SEQ ID NR:1 (adică, D2E7 VL) și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2 (adică, D2E7 VH). În anumite realizări, anticorpul cuprinde o regiune constantă a catenei grele, cum ar fi o regiune constantă IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, iIgA, IgE, IgM sau IgD. De preferință, regiunea constantă a a catenei grele este o regiune constantă a catenei grele IgG1 sau o regiune constantă a catenei grele IgG4. Mai mult, anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a catenei ușoare, fie o regiune constantă kappa a catenei ușoare, fie o regiune constantă lambda a catenei



ușoare. De preferință, anticorpul cuprinde o regiune constantă kappa a catenei ușoare. Alternativ, porțiunea anticorp poate fi, de exemplu, un fragment Fab sau un fragment mono catenar Fv.

În încă alte realizări, invenția asigură un anticorp uman izolat, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, având domenii CDR3 VL și VH înrudite D2E7, de exemplu, anticorpi, sau porțiuni de legare antigen ale acestora, cu regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) având un domeniu CDR3 cuprinzând o secvență aminoacidă selectată din grupul care constă din SEQ ID NR:3, SEQ ID NR:11, SEQ ID NR:12, SEQ ID NR:13, SEQ ID NR:14, SEQ ID NR:15, SEQ ID NR:16, SEQ ID NR:17, SEQ ID NR:18, SEQ ID NR:19, SEQ ID NR:20, SEQ ID NR:21, SEQ ID NR:22, SEQ ID NR:23, SEQ ID NR:24, SEQ ID NR:25 și SEQ ID NR:26 sau cu regiune variabilă a catenei grele (HCVR) având un domeniu CDR3 cuprinzând o secvență aminoacidă selectată din grupul constând din SEQ ID NR:4, SEQ ID NR:27, SEQ ID NR:28, SEQ ID NR:29, SEQ ID NR:30, SEQ ID NR:31, SEQ ID NR:32, SEQ ID NR:33, SEQ ID NR:34 și SEQ ID NR:35.

În încă altă realizare, invenția asigură un anticorp uman recombinant, sau o porțiune de legare antigen a acestuia, care neutralizează activitatea TNF α uman dar nu a TNF β uman. De preferință, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, neutralizează, de asemenea, TNF α de cimpanzeu și cel puțin un TNF α de la un primat suplimentar selectat din grupul care constă din TNF α de babuin, TNF α de sanguin, TNF α de cynomolgus și TNF α de la rhesus. De preferință, anticorpul, sau porțiunea de legare antigen a acestuia, neutralizează TNF α uman, de la cimpanzeu și/sau TNF α de la o primată suplimentară într-un test standard L929 *in vitro* cu un IC₅₀ 1x10⁻⁸ M sau mai mic, mai preferat 1x10⁻⁹ M sau mai mic, și chiar mai preferat 5x10⁻¹⁰ M sau mai mic. Într-o subrealizare, anticorpul neutralizează de asemenea activitatea TNF α canin, de preferință într-un test standard L929 *in vitro* cu un IC₅₀ de 1x10⁻⁷ M sau mai puțin, mai preferat 1x10⁻⁸ M sau mai puțin și chiar mai preferat 5x10⁻⁹ M sau mai puțin. În altă subrealizare, anticorpul neutralizează de asemenea activitatea TNF α de la porc, de preferință cu IC₅₀ de 1x10⁻⁷ M sau mai puțin, mai preferat 1x10⁻⁸ M sau mai puțin și chiar mai preferat 5x10⁻⁹ M sau mai puțin.

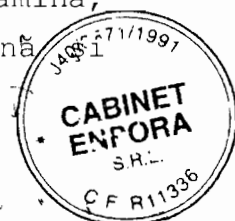


1×10^{-5} M sau mai puțin, mai preferat 1×10^{-6} M sau mai puțin și chiar mai preferat 5×10^{-7} M sau mai puțin. În încă altă realizare, anticorpul neutralizează de asemenea activitatea TNF α de la șoarece, de preferință cu IC₅₀ de 1×10^{-4} M sau mai puțin, mai preferat 1×10^{-5} M sau mai puțin sau chiar mai preferat 5×10^{-6} M sau mai puțin.

Un anticorp sau porțiune anticorp ale invenției pot fi derivate sau legate la altă moleculă funcțională (de exemplu, altă peptidă sau proteină) în conformitate, anticorpilor sau porțiunile de anticorp ale invenției intenționează să includă forme derivate sau modificate în alt fel ale anticorpilor umani anti-hTNF α descriși aici, incluzând molecule de imunoadeziune. De exemplu, un anticorp sau porțiune de anticorp ale invenției pot fi legați funcțional (prin cuplare, fuziune genetică, asociere necovalentă sau în alt fel) la una sau mai multe alte entități moleculare, cum ar fi alt anticorp (de exemplu, un anticorp bispecific sau un diacorp), un agent detectabil, un agent citotoxic, un agent farmaceutic, și/sau o proteină sau peptidă care poate media asocierea anticorpului sau porțiunii de anticorp cu altă moleculă (cum ar fi o regiune miez streptavidină sau o coadă polihistidină).

Un tip de anticorp derivatizat este produs prin legarea încrucișată a doi sau mai mulți anticorpi (de același tip sau tipuri diferite, de exemplu, pentru a crea anticorpi bispecifici). Linkeri încrucișați includ pe cei care sunt heterofuncționali, care au două grupări reactive distincte separate printr-un distanțier corespunzător (de exemplu, ester m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidă) sau homobifuncțional (de exemplu, suberat de disuccinimidil). Astfel de linkeri sunt accesibili de la Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Agenți detectabili utili cu care un anticorp sau porțiune anticorp a invenției pot fi derivați, includ compuși fluorescenți. Agenți fluorescenți detectabili exemplificatori includ fluoresceină, izotiocianat de fluoresceină, rodamină, clorură de 5-dimetilamin-1-naftalensulfonil, ficoeritrină



alții. De asemenea, un anticorp poate fi derivat cu enzime detectabile, cum ar fi fosfatază alcalină, peroxidază de la hrean, glucoz oxidază și altele. Când un anticorp este derivat cu o enzimă detectabilă el se detectează adăugând reactivi suplimentari care folosesc enzima pentru a da un produs de reacție detectabil. De exemplu, când este prezent agentul detectabil peroxidază de la hrean, adăugarea de apă oxigenată și diaminobenzidină conduce la un produs de reacție colorat care este detectabil. Un anticorp poate fi derivat cu biotină și detectat prin măsurare indirectă a legării avidinei sau streptavidinei.

II. Expresia anticorpilor

Un anticorp, sau porțiune anticorp, a invenției se poate prepara prin expresie recombinantă a genelor catenei ușoare și grea ale imunoglobulinei într-o celulă gazdă. Pentru a exprima un anticorp recombinant, o celulă gazdă este transfectată cu unul sau mai mulți vectori de expresie recombinanți care conțin fragmente ADN care codifică catenele ușoară și grea ale imunoglobulinei ale anticorpului astfel încât catenele ușoară și grea sunt exprimate în celula gazdă și, de preferință, secretate în mediul în care sunt cultivate celule gazdă, mediu din care se pot recupera anticorpii. Metodologiile ADN recombinante standard sunt folosite pentru a obține catenele grea și ușoară ale anticorpilor, se încorporează aceste gene în vectori de expresie recombinanți și se introduc vectorii în celule gazdă precum cei descriși în Sambrook, Fritsch și Maniatis (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) și în brevetul SUA 4.816.397 de Boss et al.

Pentru a exprima anticorp D2E7 sau anticorp înrudit D2E7 mai întâi sunt obținute, fragmente ADN care codifică regiunile variabile ale catenei ușoară și grea. Aceste ADN-uri pot



secvențelor variabile ale catenei ușoară și grea folosind reacția polimerazică de catenă (PCR). Secvențele ADN ale liniei germinale pentru genele regiunii variabile ale catenei grea și ușoară umane sunt cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, "Vbase" baza de date pentru secvențe ale liniilor germinale umane; vezi, de asemenea, Kabat, E.A., et al. (1991) - *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-698; și Cox, J.P.L. et al (1994) "A Directory of Human Germ-line V_K Segments Reveals a Strong Bias in Their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; conținuturile fiecăreia fiind expres încorporate aici ca referință). Pentru a obține un fragment ADN care codifică regiunea variabilă a catenei grele a anticorpului D2E7 sau unui anticorp înrudit D2E7, un membru al familiei V_H3 al genelor liniei germinale VH este amplificat prin PCR standard. Cel mai preferat, este amplificată secvența liniei germinale DP-31 VH. Pentru a obține un fragment ADN care codifică regiunea variabilă a catenei ușoare a anticorpului D2E7 sau unui anticorp înrudit D2E7, un membru al familiei V_KI al genelor liniei germinale VL este amplificat prin PCR standard. Cel mai preferat, este amplificată secvența liniei germinale A20 VL. Primeri PCR corespunzători pentru utilizare în amplificarea liniei germinale DP-31 VH și liniei germinale A20 VL, secvențele se pot desemna pe baza secvențelor nucleotidice discutate în referințele citate *supra*, folosind metode standard.

O dată ce sunt obținute fragmentele liniei germinale VH și VL, aceste secvențe pot fi mutate pentru a codifica secvențele aminoacide D2E7 sau înrudite D2E7 descrise aici. Secvențele aminoacide codificate prin secvențele ADN ale liniei germinale VH și VL sunt comparate mai întâi la secvențele aminoacide VH și VL pentru D2E7 și înrudite D2E7 pentru identificarea resturilor aminoacide din secvența D2E7 sau înrudită D2E7 care diferă de linia germinală. Apoi, nucleotidele corespunzătoare



secvențelor ADN ale liniei germinale sunt mutate astfel încât secvența liniei germinale mutate codifică secvența aminoacidă D2E7 sau înrudită D2E7, folosind codul genetic pentru a determina care schimbări nucleotidice ar putea fi făcute. Mutageneza secvențelor liniei germinale se realizează prin metode standard, cum ar fi mutageneză mediată PCR (în care nucleotidele mutate sunt încorporate în primerii PCR, astfel că produsul PCR conține mutațiile) sau mutagenază dirijată în sit.

Mai mult, ar fi de remarcat că dacă secvențele "liniei germinale" obținute prin amplificare PCR codifică diferențe aminoacide în regiunile cadru de la configurația adevărată a liniei germinale (adică, diferențele în secvența amplificată cum s-au comparat la secvența liniei germinale adevărate, de exemplu, ca un rezultat al mutației somatice), poate fi de dorit să se schimbe aceste diferențe aminoacide înapoi la secvențele liniei germinale adevărate (adică, "mutație înapoi" a resturilor cadrului la configurația liniei germinale).

O dată ce fragmentele ADN care codifică segmente VH și VL ale D2E7 sau înrudite D2E7 sunt obținute (prin amplificare și mutageneză a liniei germinale VH și VL, cum s-a descris mai sus) aceste fragmente ADN pot fi manipulate în continuare prin tehnici ADN recombinant standard, de exemplu, pentru convertirea genelor regiunii variabile la genele catenei anticorpului de lungime întreagă, la genele fragmentului Fab, sau la o genă scFv. În aceste manipulări, un fragment ADN care codifică VL sau VH este legat operațional la alt fragment ADN care codifică altă proteină, cum ar fi o regiune constantă a unui anticorp sau un linker flexibil. Termenul "legată operațional" așa cum s-a folosit în acest context, intenționează să însemne că cele două fragmente ADN sunt unite astfel încât secvențele aminoacide codificate de cele două fragmente ADN rămân în cadru.

ADN-ul izolat care codifică regiunea VH poate fi transformat la o genă a catenei grele de lungime întreagă, legând operațional ADN-ul care codifică VH la altă moleculă de ADN care codifică regiunile constante ale catenei grele (CH1, CH2 și CH3).

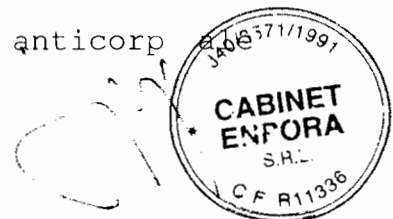


Secvențele genelor regiunii constante ale catenei grele umane sunt cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, Kabat, E.A., et al. (1991)-*Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) și fragmente ADN care cuprind aceste regiuni se pot obține prin amplificare PCR standard. Regiunea constantă a catenei grele poate fi o regiune constantă IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM sau IgD, dar cel mai preferat este o regiune constantă IgG1, sau IgG4. Pentru un fragment Fab gena catenei grele, ADN-ul care codifică VH poate fi legat operațional la altă moleculă ADN care codifică numai regiunea constantă CH1 a catenei grele.

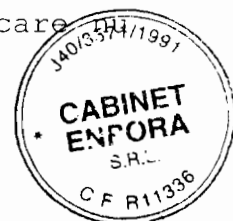
ADN-ul izolat care codifică regiunea VL poate fi transformat la gena catenei ușoare de lungime întreagă (precum o genă a catenei ușoare Fab) prin legarea operațională a ADN-ului care codifică VL la altă moleculă ADN care codifică regiunea constantă a catenei ușoare, CL. Secvențele genelor regiunii constante ale catenei ușoare umane sunt cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, Kabat, E.A., et al. (1991)-*Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) și fragmentele ADN care cuprind aceste regiuni pot fi obținute prin amplificare PCR standard. Regiunea constantă a catenei ușoare poate fi o regiune constantă kappa sau lambda, dar cel mai preferat este o regiune constantă kappa.

Pentru a crea o genă scFv, fragmentele ADN care codifică VH- și VL- sunt legate operațional la alt fragment care codifică un linker flexibil, de exemplu, codifică secvența aminoacidă (Gly₄-Ser)₃, astfel încât secvențele VH și VL pot fi exprimate ca o proteină contiguă cu o singură catenă, cu regiunile VL și VH legate prin linkerul flexibil (vezi, de exemplu, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554).

Pentru a exprima anticorpii sau porțiuni anticorp



invenției, ADN-urile care codifică catenele ușoară și grea parțiale, sau de lungime întreagă, obținute cum s-a descris mai sus, sunt inserate în vectori de expresie astfel încât genele sunt legate operațional la secvențe de control transcripțional și translațional. În acest context, termenul "legat operațional" intenționează să însemne că o genă anticorp este legată într-un vector astfel încât secvențele de control transcripțional și translațional din vector servesc funcției lor intenționate de reglare a transcripției și translației genei anticorp. Vectorul de expresie și secvențele de control ale expresiei sunt alese pentru a fi compatibile cu expresia celulei gazdă folosite. Gena catenei ușoare a anticorpului și gena catenei grele a anticorpului, pot fi inserate în vector separat sau, mai obișnuit, ambele gene sunt inserate în același vector de expresie. Genele anticorpului sunt inserate în vectorul de expresie prin metode standard (de exemplu, situri de expresie complementare ligării pe fragmentul genei anticorpului și vector, sau ligare la capăt teșit dacă nu sunt prezente situri de restricție). Înaintea inserării catenelor ușoară sau grea ale D2E7 sau înrudit D2E7, vectorul de expresie poate să conțină deja secvențele regiunii constante a anticorpului. De exemplu, o abordare pentru transformarea secvențelor VH și VL D2E7 și înrudit D2E7 la gene anticorp de lungime întreagă este să se însereze acestea în vectori de expresie care codifică deja regiuni constante ale catenei grele și, respectiv regiuni constante ale catenei ușoare, astfel încât segmentul VH este legat operațional la segmentul(e) CH din vector și segmentul VL este legat operațional la segmentul CL din vector. Suplimentar sau alternativ, vectorul de expresie recombinant poate codifica o peptidă semnal care facilitează secreția catenei anticorpului dintr-o celulă gazdă. Gena catenei anticorpului poate fi clonată în vector astfel încât peptida semnal este legată în cadru la terminusul amino al genei catenei anticorpului. Peptida semnal poate fi o peptidă semnal imunoglobulină sau o peptidă semnal heteroloagă (adică, o peptidă semnal de la o proteină care



este imunoglobulină).

Suplimentar la genele catenei anticorpului, vectorii recombinanți de expresie ai invenției conțin secvențe reglatoare care controlează expresia genelor catenei anticorpului într-o celulă gazdă. Termenul "secvență reglatoare" intenționează să includă promotori, intensificatori și alte elemente de control ale expresiei (de exemplu, semnale de poliadenilare) care controlează transcripția sau translația genelor catenei anticorpului. Astfel de secvențe reglatoare sunt descrise, de exemplu, în Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Se va aprecia de către cei cu pregătire în domeniu că desemnarea vectorului de expresie, inclusiv selecția secvențelor reglatoare, poate să depindă de astfel de factori ca alegerea celulei gazdă care trebuie transformată, nivelul expresiei proteinei dorite, etc. Secvențe reglatoare preferate pentru expresia unei celule gazdă de la mamifer includ elemente virale care dirijează expresia proteinei la niveluri ridicate în celule de la mamifere, cum ar fi promotori și/sau intensificatori derivați de la citomegalovirus (CMV) (cum ar fi promotorul/intensificatorul CMV), virusul simian 40 (SV40) (cum ar fi promotorul/intensificatorul SV40), adenovirus (de exemplu, promotorul târziu principal al adenovirusului (AdMLP)) și polioma. Pentru descrierea suplimentară a elementelor reglatoare virale și secvențele acestora, vezi de exemplu, brevet SUA 5.168.062 de Stinski, brevet SUA 4.510.245 de Bell et al. și brevet SUA 4.968.615 de Schaffner et al.

În plus la genele catenei anticorpului și secvențele reglatoare, vectorii recombinanți de expresie ai invenției pot să conțină secvențe suplimentare, cum ar fi secvențele care reglează replicarea vectorului în celule gazdă (de exemplu, originile replicării) și gene marker selectabil. Gena marker selectabil facilitează selecția celulelor gazdă în care s-a introdus vectorul (vezi, de exemplu, brevet SUA 4.399.216, 4,634.665 și 5.179.017 toate de Axel et al.). De exemplu, gene



marker selectabil tipice conferă rezistență la medicamente, cum ar fi G418, higromicină sau metotrexat, pe o celulă gazdă în care s-a introdus vectorul. Gene marker selectabil preferate includ gena dihidrofolat reductază (DHFR) (pentru utilizare în celule gazdă dhfr⁻ cu selecție/amplificare metotrexat) și gena neo (pentru selecție G418).

Pentru expresia catenelor ușoară și grea, vectorul (i) de expresie care codifică catenele grea și ușoară se transfectează într-o celulă gazdă prin tehnici standard. Diverse forme ale termenului "transfecție" sunt intenționate să cuprindă o gamă largă de tehnici folosite în mod obișnuit pentru introducerea ADN-ului exogen într-o celulă gazdă procariotică sau eucariotică, de exemplu, electroporare, precipitare fosfat de calciu, transfecție DEAE-dextran și altele. Deși teoretic este posibil să se exprime anticorpii invenției fie în celule gazdă procariotice, fie eucariotice, expresia anticorpilor în celule eucariotice și, cel mai preferat, celula gazdă de la mamifere, este cea mai preferată deoarece astfel de celule eucariotice și, în special, celule de la mamifere, sunt mai probabil decât celulele procariotice să se asemene și să secrete un anticorp pliat corespunzător și imunologic activ. Expresia procariotică a genelor anticorpului a fost raportată ca ineficientă pentru producerea cu randamente ridicate a anticorpului activ (Boss, M.A. și Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:6-13).

Celule gazdă de la mamifere, preferate pentru expresia anticorpilor recombinanți ai invenției includ celule ovariene de la hamster chinezesc (celule CHO) (incluzând celule CHO dhfr⁻, descrise în Urlaub și Chasin (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216-4220, folosite cu un marker selectabil DHFR, de exemplu, cum s-a descris în R.J.Kaufman și P.A. Sharp (1982) *Mol.Biol.* 159:601-621), celule mielomice NS0, celule COS și celule SP2. Când vectori recombinanți de expresie care codifică gene anticorp sunt introduși în celule gazdă mamifere, anticorpii sunt produși prin cultivarea celulelor gazdă pentru o perioadă de timp suficientă să permită expresia anticorpului în celulele gazdă.



sau, mai preferabil, secreția anticorpului în mediul de cultură în care sunt crescute celulele gazdă. Anticorpul pot fi recuperați din mediul de cultură folosind metode standard de purificare a proteinelor.

Celulele gazdă pot fi folosite de asemenea, pentru a produce porțiuni ale anticorpilor intacti, cum ar fi fragmente Fab sau molecule scFv. Se va înțelege că variațiile privind procedura de mai sus sunt cuprinse în prezenta invenție. De exemplu, poate fi de dorit să se transfeceteze o celulă gazdă cu ADN care codifică fie catena ușoară, fie catena grea (dar nu ambele) ale unui anticorp al acestei invenții. Tehnologia ADN recombinant poate fi de asemenea, folosită pentru a îndepărta o parte sau tot ADN-ul care codifică una sau ambele catene ușoară și grea care nu sunt necesare pentru legare la hTNF α . Moleculele exprimate de la astfel de molecule ADN scurtate, sunt de asemenea cuprinse de anticorpul invenției. Suplimentar, pot fi produși anticorpi bifuncționali în care o catenă ușoară și o catenă grea sunt ale unui anticorp al invenției și altă catenă grea și catenă ușoară sunt specifice pentru un antigen, altul decât hTNF α prin legarea încrucișată al unui anticorp al invenției la un al doilea anticorp prin metode chimice standard de legare încrucișată.

Într-un sistem preferat pentru expresie recombinantă a unui anticorp, sau porțiune de legare antigen a acestuia, al invenției, un vector recombinant de expresie care codifică atât catena grea, cât și catena ușoară ale anticorpului se introduce în celule CHO dhfr- prin transfecție mediată fosfat de calciu. În vectorul recombinant de expresie recombinantă, genele catenei grea și ușoară ale anticorpului sunt fiecare legate operațional la elemente reglatoare intensificator/promotor (de exemplu, derivate de la SV40, CMV, adenovirus și altele cum ar fi un element regulator CMV intensificator/promotor AdMLP sau un element regulator SV40 intensificator/promotor AdMLP) pentru a conduce niveluri ridicate ale transcripției genelor. De asemenea, vectorul recombinant de expresie conține o genă DHFR, care permite selecția celulelor CHO care au fost transfectate



vectorul folosind selecția/amplificarea metotrexat. Celulele gazdă transformante selectate sunt lăsate pentru expresia catenelor grea și ușoară ale anticorpului și anticorpul intact se recuperează din mediul de cultură. Tehnicile biologiei moleculare standard sunt folosite pentru prepararea vectorului de expresie recombinant, transfectarea celulelor gazdă, selectarea transformanților, cultura celulelor gazdă și recuperarea anticorpului din mediul de cultură.

Din punct de vedere al celor anterioare, alt aspect al invenției aparține acidului nucleic, vectorului și compozițiilor de celule gazdă care se pot folosi pentru expresia recombinantă a anticorpilor și porțiunilor anticorp ale invenției. Secvența nucleotidică care codifică regiunea variabilă catenă ușoară D2E7 este prezentată în Figura 7 și SEQ ID NR:36. Domeniul CDR1 al LCVR cuprinde nucleotidele 70-102, domeniul CDR2 cuprinde nucleotidele 148-168 și domeniul CDR3 cuprinde nucleotidele 265-291. Secvența nucleotidică care codifică regiunea variabilă catenă grea D2E7 este prezentată în Figura 8 și SEQ ID NR:37. Domeniul CDR1 al HCVR cuprinde nucleotidele 91-105, domeniul CDR2 cuprinde nucleotidele 148-198 și domeniul CDR3 cuprinde nucleotidele 295-330. Se va aprecia de către specialistul în domeniu că secvențele nucleotidice care codifică anticorpi înrudiți D2E7, sau porțiuni ale acestora (de exemplu, un domeniu CDR cum ar fi un domeniu CDR3), pot fi derivați de la secvențele nucleotidice care codifică LCVR și HCVR D2E7 folosind codul genetic și tehnicile biologiei moleculare standard.

Într-o realizare, invenția asigură un acid nucleic izolat care codifică un domeniu CDR3 catenă ușoară cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:3 (adică, D2E7 VL CDR3), sau modificată de la SEQ ID NR:3 printr-o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7, sau 8, sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8, și/sau 9. Acest acid nucleic poate codifica numai regiunea CDR3, sau mai preferat, codifică o regiune variabilă catenă ușoară întreagă a anticorpului (LCVR). De exemplu, acidul nucleic poate codifica



un LCVR având un domeniu CDR2 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:5 (adică, D2E7 VL CDR2) și un domeniu CDR1 cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:7 (adică, D2E7 VL CDR1).

În altă realizare, invenția asigură un acid nucleic izolat care codifică un domeniu CDR3 catenă grea cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:4 (adică, D2E7 VH CDR3), sau modificată de la SEQ ID NR:4 printr-o singură substituție alanină la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11, sau prin 1 la 5 substituții aminoacide conservative la pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, și/sau 12. Acest acid nucleic poate codifica numai regiunea CDR3, sau mai preferat, codifică o regiune variabilă catenă grea întreagă a anticorpului (HCVR). De exemplu, acidul nucleic poate codifica un HCVR având un domeniu CDR2 care cuprinde secvența aminoacidă a SEQ ID NR:6 (adică, D2E7 VH CDR2) și un domeniu CDR1 cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:8 (adică, D2E7 VH CDR1).

În încă altă realizare, invenția asigură acizii nucleici izolați care codifică un domeniu CDR3 înrudit D2E7, de exemplu, cuprinzând o secvență aminoacidă selectată din grupul care constă din: SEQ ID NR:3, SEQ ID NR:4, SEQ ID NR:11, SEQ ID NR:12, SEQ ID NR:13, SEQ ID NR:14, SEQ ID NR:15, SEQ ID NR:16, SEQ ID NR:17, SEQ ID NR:18, SEQ ID NR:19, SEQ ID NR:20, SEQ ID NR:21, SEQ ID NR:22, SEQ ID NR:23, SEQ ID NR:24, SEQ ID NR:25, SEQ ID NR:26, SEQ ID NR:27, SEQ ID NR:28, SEQ ID NR:29, SEQ ID NR:30, SEQ ID NR:31, SEQ ID NR:32, SEQ ID NR:33, SEQ ID NR:34, și SEQ ID NR:35.

În încă altă realizare, invenția asigură un acid nucleic izolat care codifică o regiune variabilă catenă ușoară a unui anticorp cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:1 (adică, D2E7 LCVR). De preferință, acest acid nucleic cuprinde secvența nucleotidică a SEQ ID NR:36, deși specialistul în domeniu va aprecia că datorită degenerării codului genetic, și alte secvențe nucleotidice pot codifica secvența aminoacidă a SEQ ID NR:1. Acidul nucleic poate codifica numai LCVR-ul sau poate de asemenea codifica regiunea constantă catenă ușoară, legată operațional la LCVR. Într-o realizare, acest acid nucleic este un vecin



recombinant de expresie.

În încă altă realizare, invenția asigură un acid nucleic izolat care codifică o regiune variabilă catenă grea a unui anticorp cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2 (adică, D2E7 HCVR). De preferință, acest acid nucleic cuprinde secvența nucleotidică a SEQ ID NR:37, deși specialistul în domeniu va aprecia că datorită degenerării codului genetic, și alte secvențe nucleotidice pot codifica secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2. Acidul nucleic poate codifica numai HCVR-ul sau poate, de asemenea, să codifice regiunea constantă catenă grea, legată operațional la HCVR. De exemplu, acidul nucleic poate cuprinde o regiune constantă IgG1 sau IgG4. Într-o realizare, acest acid nucleic este un vector recombinant de expresie.

De asemenea, invenția asigură vectori recombinanți de expresie care codifică atât o catenă grea a anticorpului, cât și o catenă ușoară a anticorpului. De exemplu, într-o realizare, invenția asigură un vector recombinant de expresie care codifică:

a) o catenă ușoară a unui anticorp având o regiune variabilă cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:1 (adică, D2E7 LCVR); și

b) o catenă grea a unui anticorp având o regiune variabilă cuprinzând secvența aminoacidă a SEQ ID NR:2 (adică, D2E7 HCVR).

De asemenea, invenția asigură celule gazdă în care s-au introdus unul sau mai mulți vectori recombinanți de expresie. De preferință, celula gazdă este o celulă gazdă de la mamifer, mai preferat, celula gazdă este o celulă CHO, o celulă NS0, sau o celulă COS.

Încă suplimentar, invenția asigură o metodă de sinteză a unui anticorp recombinant uman al invenției prin cultivarea unei celule gazdă a invenției într-un mediu de cultură adecvat până când se sintetizează un anticorp recombinant uman al invenției. Metoda poate cuprinde în plus, izolarea anticorpului uman recombinant din mediul de cultură.

III. Selectia anticorpilor umani recombinanti



Anticorpi recombinanți umani ai invenției suplimentar față de D2E7 sau anticorpi înrudiți D2E7 descriși aici pot fi izolați în cercetarea unei bănci de anticorpi recombinanți combinatoriali, de preferință, o bancă care prezintă un fag scFv, preparată folosind cADN-uri VL și VH preparate de la mARN din limfocite umane. Metodologii pentru prepararea și cercetarea de astfel de bănci sunt cunoscute în domeniu. Suplimentar, la trusele accesibile comercial pentru generarea băncilor care prezintă fag (de exemplu, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog nr. 27-9400-01; și kit-ul de prezentare fag Stratagene SurfZAP™, catalog nr. 240612), exemple de metode și reactivi favorabili în mod deosebit pentru folosire în generarea și cercetarea băncilor care prezintă anticorp pot fi găsite în, de exemplu, Ladner et al. brevet US nr. 5.223.409; Kang et al. Publicare PCT nr. WO 92/19619; Dower et al publicare PCT nr. WO 91/17271; Winter et al publicare PCT nr. WO 92/20791; Markland et al., publicație PCT nr. WO 92/15679; Breitling et al. Publicare PCT nr. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicare PCT nr. WO 92/01047; Garrard et al., publicare PCT nr. WO 92/09690; Fuchs et al.(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al.(1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Friffithd et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al.(1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson et al.(1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al.(1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al.(1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom et al.(1991) *Nuc Acids Res* 19:4133-4137; și Barbas et al.(1991) *PNAS* 88:7978-7982.

Într-o realizare preferată, pentru izolarea anticorpilor umani cu afinitate crescută și o constantă a ratei de detașare redusă pentru hTNF α , s-a folosit mai întâi un anticorp murin anti-hTNF α având afinitate crescută și o rată de detașare redusă pentru hTNF α (de exemplu, MAK 195, hibridom pentru care există depozitul cu numărul ECACC 87 050801) pentru selectarea secvențelor catenei grea și ușoară umane care au activitate



legare similară față de hTNF α , folosind epitop de supraimprimare, sau selecția ghidată, metode descrise în Hoogenboom et al. Publicația PCT WO 93/06213. Băncile de anticorp folosite în această metodă sunt de preferință bănci scFv preparate și cercetate cum s-a descris în McCafferty et al., publicația PCT WO 92/011047, McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; și Griffiths et al., (1993) *EMBO J* 12:725-734. Băncile de anticorp scFv sunt cercetate de preferință folosind TNF α uman recombinant ca antigen.

O dată ce segmentele umane inițiale VL și VH selectat, sunt realizate experimente "amestec și împerechere", în care diferite perechi ale segmentelor VL și Vh inițiale sunt cercetate pentru legare hTNF α pentru a selecta combinații pereche preferată VL/VH. Suplimentar, pentru a îmbunătăți afinitatea și/sau constanta ratei detașării pentru legare hTNF α , segmentele VL și VH ale perechi(lor) VL/VH preferate pot fi mutate randomic, de preferință în regiunea CDR3 a VH și/sau VL, într-un proces analog procesului de mutație somatică *in vivo* responsabil pentru maturarea afinității anticorpilor în timpul răspunsului imun natural. Această maturare a afinității *in vitro* se poate realiza prin amplificarea regiunilor VH și VL folosind primeri PCR complementari la CDR3 VH sau respectiv VL CDR3, primeri care au fost "fixați" cu un amestec randomic de 4 baze nucleotidice la anumite poziții astfel încât produsele PCR rezultate codifică segmente VH și VL în care mutațiilor randomice au fost introduse în regiunile CDR3 VH și/sau VL. Aceste segmente VH și VL mutate randomic pot fi cercetate pentru legare la hTNF α și secvențele care prezintă activitate ridicată și rată de detașare scăzută pentru hTNF α pot fi selectate.

Secvențele aminoacide ale catenelor grea și ușoară ale anticorpului pot fi comparate la secvențele aminoacide ale catenei grea și ușoară ale liniei germinale. În cazul unde anumite resturi ale cadrului catenelor selectate VL și/sau VH diferă de configurația liniei germinale (de exemplu, ca un rezultat al mutației somatice a genelor imunoglobulinei folosite

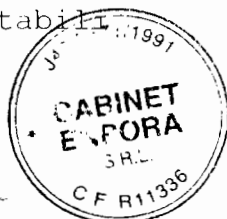


pentru a prepara banca de fag), se poate dori să se "mute înapoi" resturile modificate ale cadrului ale anticorpilor selectați față de configurația liniei germinale (adică, schimbarea secvențelor aminoacide ale cadrului anticorpilor selectați astfel încât ele sunt aceleași ca secvențele aminoacide ale cadrului liniei germinale). Astfel de "mutație înapoi" (sau "alinieră germinală") a resturilor cadrului se poate realiza prin metodele biologiei moleculare standard pentru introducerea mutațiilor specifice (de exemplu, mutagenază dirijată în sit; mutagenază mediată PCR, și altele).

După cercetarea și izolarea unui anticorp anti-hTNF α al invenției din banca prezentată de imunoglobulină recombinantă, acidul nucleic care codifică anticorpul selectat poate fi recuperat din seria prezentată (de exemplu, de la genomul fagului) și subclonat în alți vectori de expresie prin tehnici ADN recombinant standard. Dacă se dorește, acidul nucleic poate fi manipulat suplimentar pentru a crea alte forme anticorp ale invenției (de exemplu, legat la acid nucleic care codifică domenii suplimentare ale imunoglobulinei, cum ar fi regiuni constante suplimentare). Pentru a exprima un anticorp uman recombinant izolat prin cercetarea unei bănci combinatoriale, ADN-ul care codifică anticorpul este clonat într-un vector recombinant de expresie și introdus în celule gazdă mamifere, cum s-a descris în detalii suplimentare în Secțiunea II de mai sus.

IV. Compoziții și administrare farmaceutică

Anticorpii și porțiunile anticorp ale invenției pot fi încorporate în compoziții farmaceutice pentru administrare la un subiect. De obicei, compoziția farmaceutică cuprinde un anticorp sau porțiune anticorp a invenției și un purtător acceptabil farmaceutic. Așa cum s-a folosit aici, "purtător acceptabil farmaceutic" include oricare și toții solvenții, medii de dispersie, acoperiri, agenți antibacterieni și antifungici, agenți izotonici și de întârziere a absorpției, și altele care sunt compatibile fiziologic. Exemple de purtători acceptabili



farmaceutic includ unul sau mai mulți dintre apă, soluție salină, soluție salină tamponată fosfat, dextroză, glicerol, etanol și altele, precum și combinații ale lor. În numeroase cazuri, va fi preferat să se includă agenți izotonici, de exemplu, zaharuri, polialcoolii ca manitol, sorbitol, sau clorură de sodiu în compoziție. Purtători acceptabili farmaceutic pot să cuprindă suplimentar cantități minore de substanțe auxiliare cum ar fi agenți de umectare sau emulgatori, conservanți sau tampon, care intensifică durata termenului de valabilitate, sau eficiența anticorpului sau porțiunii anticorp.

Compozițiile acestei invenții pot fi într-o diversitate de forme. Acestea includ, de exemplu, forme de dozaj lichide, semisolide și solide cum ar fi soluții lichide (de exemplu, soluții injectabile sau infuzabile), dispersii sau suspensii, tablete, pilule, pulberi, lipozomi și supozitoare. Forma preferată depinde de modul intenționat de administrare și aplicare terapeutică. Compoziții tipice preferate sunt sub formă de soluții injectabile sau infuzabile, cum ar fi compoziții similare celor folosite pentru imunizarea pasivă a oamenilor cu alți anticorpi. Modul preferat de administrare este parenteral (de exemplu, intravenos, subcutanat, intraperitoneal, intramuscular). Într-o realizare preferată, anticorpul se administrează prin infuzie sau injectare intravenoasă. În altă realizare preferată, anticorpul se administrează prin injectare intramusculară sau subcutanată.

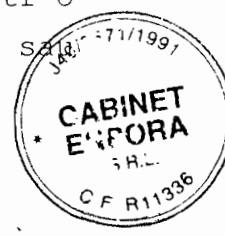
Compoziții terapeutice tipice trebuie să fie sterile și stabile în condițiile de fabricare și depozitare. Compoziția poate fi formulată ca o soluție, microemulsie, dispersie, lipozom, sau altă structură ordonată adecvată pentru concentrații crescute ale medicamentului. Soluțiile injectabile sterile pot fi preparate prin încorporarea compusului activ (adică, anticorp sau porțiune anticorp) în cantitatea cerută dintr-un solvent corespunzător cu unul sau o combinație de ingrediente enumerate mai sus, după cum este necesar, urmat de sterilizare prin filtrare. În general, dispersiile sunt preparate fie prin



încorporarea compusului activ într-un vehicul steril care conține un mediu de dispersie de bază și necesită alte ingrediente dintre cele enumerate mai sus. În cazul pulberilor sterile, pentru prepararea soluțiilor injectabile sterile, metodele preferate de preparare sunt uscarea sub vid și liofilizarea care dă o pulbere a ingredientului activ plus orice ingredient suplimentar dorit dintr-o soluție filtrată steril anterior a acestuia. Fluiditatea corespunzătoare a unei soluții poate fi menținută, de exemplu, prin folosirea unei acoperiri cum ar fi lecitina, prin menținerea mărimii cerute a particulei în cazul dispersiei și prin folosirea surfactanților. Absorbția prelungită a compozițiilor injectabile poate fi obținută prin includerea în compoziție a unui agent care întârzie absorbția, de exemplu, săruri monostearat și gelatină.

Anticorpii și porțiunile anticorp ale prezentei invenții pot fi administrate printr-o diversitate de metode cunoscute în domeniu, deși pentru numeroase aplicații terapeutice ruta/modul preferat de administrare este injectarea intravenoasă sau infuzia. Așa cum va fi apreciat de către specialistul în domeniu, ruta și/sau modul de administrare vor varia depinzând de rezultatele dorite. În anumite realizări, compusul activ poate fi preparat cu un purtător care va proteja compusul împotriva eliberării rapide, cum ar fi o formulare cu eliberare controlată, incluzând implante, plasturi transdermali și sisteme de eliberare microîncapsulate. Pot fi folosiți polimeri biodegradabili, biocompatibili, cum ar fi acetat de etilenvinil, polianhidride, acid poliglicolic, colagen, poliortoesteri și acid polilactic. Numeroase metode pentru prepararea de asemenea formulări sunt brevetate sau cunoscute în general celor cu pregătire în domeniu. Vezi, de exemplu, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

În anumite realizări, un anticorp sau porțiuni anticorp ale invenției pot fi administrate oral, de exemplu, cu un diluent inert, sau un purtător comestibil asimilabil. Compusul (și alte ingrediente, dacă se dorește) poate fi închis de asemenea, într-o cochilie de gelatină dură sau moale, comprimată în tablete, sau



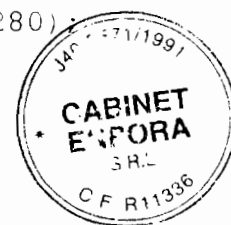
încorporată direct în dieta subiectului. Pentru administrare terapeutică orală, compușii pot fi încorporați cu excipiente și folosiți sub formă de tablete ingerabile, tablete bucale, gelule, capsule, elixire, suspensii, siropuri, cașete și altele. Pentru a administra un compus al invenției altfel decât administrare parenterală, poate fi necesar să se acopere compusul cu, sau să se coadministreze compusul cu, un material pentru prevenirea inactivării sale.

De asemenea, în compoziție pot fi încorporați compuși activi suplimentar. În anumite realizări, un anticorp sau porțiune anticorp a invenției este coformulat cu și/sau coadministrat cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari, care sunt utili pentru tratarea tulburărilor în care activitatea TNF α este dăunătoare. De exemplu, un anticorp anti-hTNF α sau o porțiune de anticorp al invenției poate fi coformulat și/sau coadministrat cu unul sau mai mulți anticorpi suplimentari, care se leagă la alte ținte (de exemplu, anticorpi care leagă alte citokine, sau care se leagă la moleculele suprafeței celulare), una sau mai multe citokine, receptor TNF α solubil (vezi, de exemplu, publicația PCT WO 94/06476) și/sau unul sau mai mulți agenți chimici care inhibă producerea sau activitatea hTNF α (cum ar fi derivați ciclohexan-iliden cum s-au descris în publicația PCT WO 93/19751). În plus, unul sau mai mulți anticorpi ai invenției pot fi folosiți în combinație cu 2 sau mai mulți agenți terapeutici anteriori. Astfel de terapii combinate pot să utilizeze avantajos doze mai scăzute ale agenților terapeutici administrați evitând astfel toxicității posibile sau complicațiile asociate cu diverse monoterapii.

Exemple nelimitative de agenți terapeutici pentru artrită reumatoidă cu care un anticorp sau porțiune anticorp a invenției poate fi combinat include următoarele: medicamente(e) antiinflamatoare nesteroidice (NSAID); medicament(e) antiinflamatoare supresive ale citokinei (CSAID); CDP-561/BAY-10-3356 (anticorp umanizat anti-TNF α ; Celltech/Bayer); cA2 (anticorp himeric anti-TNF α ; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune



75 kD TNF receptor-IgG; Immunex; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol.37, S295; *J.Ivest.Med.* (1996) Vol.44:235A); 55 kDTNFR-IgG (proteină de fuziune 55 kD TNF receptor-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB210396 (anticorp anti-CD4 primatizat neapuizat; IDEC/SmithKline; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol.38, S185(; DAB 486-IL-2 și/sau DAB 389-IL-2 (proteine de fuziune IL-2; Seragen; vezi de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol.36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2R α umanizate; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citokină antiinflamatorie; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinant, citokină antiinflamatorie; DNAX/Schering); IL-4; agoniști IL-10 și/sau IL-4 (de exemplul, anticorpi agoniști); IL-1RA (antagonist receptor IL-1; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (proteină de legare TNF solubilă; vezi de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, nr. 9(supliment); S284; *Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol.268, p.37-42); R973401(inhibitor fosfodiesterază tip IV; veri, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, nr.9(supliment),S282); MK.966 (inhibitor COX-2; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, nr.9(supliment),S81); Iloprost (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39, nr.9(supliment), S82); metotrexat; talidomidă (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39,nr.9(supliment),S282) și medicamente talidomidă legată (de exemplu, Celgen); leflunomidă (inhibitori citokină și antiinflamatori; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol.39,nr.9(supliment), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol.45, p.103-107); acid tranexamic (inhibitor al activității plasminogen; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S284); T-614(inhibitor citokină; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment),S282); prostaglandin E1 (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S282); Tenidap (medicament nesteroid antiinflamator; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment),S280).



Naproxen (medicament nesteroid antiinflamator; vezi, de exemplu, *Neuro Report* (1996) Vol.7, p.1209-1213); Meloxicam (medicament nesteroidal antiinflamator); Ibuprofen (medicament nesteroidal antiinflamator); Piroxicam (medicament nesteroidal antiinflamator); Diclofenac (medicament nesteroidal antiinflamator); Indometacin (medicament nesteroidal antiinflamator); Sulfasalazină (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S281); Azatioprină (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S281); inhibitor ICE (inhibitor al enzimei interleukin-1 β enzimă de acoperire); inhibitor zap-70 și/sau lck (inhibitor al tirozin kinaza zap-70 sau lck); inhibitor VEGF și/sau inhibitor VEGF-R (inhibitori al factorului de creștere vascular al celulei endoteliale sau receptor factor de creștere vascular al celulei endoteliale; inhibitori ai angiogenezei); medicamente corticosteroide antiinflamatorii (de exemplu, SB203580); inhibitori TNF-convertoază; anticorpi anti-IL-12; interleukin-11 (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S296); interleukin-13 (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S308); inhibitori interleukin-17 (vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, nr.9(supliment), S120); aur; penicilamină; clorochină; hidroxiclrochină; clorambucil; ciclofosamidă; ciclosporină; iradiere totală limfoid; globulină antitimocit; anticorpi anti-CD4; toxine-CD5; peptide administrate oral și colagen; lobenzarit disodiu; Cytokine Regulating Agents (CRA-uri (HP228 și HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodeoxinucleotidă fosforotioat antisens ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 complement solubil (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednison; orgotein; glicosaminoglican polisulfat; minociclină; anticorpi anti-IL2R; lipide marine și botanice (acizi grași din pește și din semințe de plante; vezi, de exemplu, DeLuca et al. (1995) *Theum.Dis.Clin.North Am.* 21:759-777); auranofin; fenilbutazonă; acid meclofenamic; acid flufenamic; globulin intravenos imun; zileuton; acid micofenolic



(RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicin); amipriloză (terafectin); cladribină (2-clorodeoxiadenozin); și azaribină.

Exemple nelimitative de agenți terapeutici pentru boala inflamatorie a intestinului cu care un anticorp, sau porțiune anticorp a invenției pot fi combinate, includ următoarele; budenozidă; factorul de creștere epidermal; corticosteroizi; ciclosporină, sulfasalazină; aminosalicilați; 6-mercaptopurină; azatioprină; metronidazol; inhibitori lipoxigenază; mesalamină; olsalazin; balsalazidă; antioxidanți; inhibitori tromboxan; antagoniști receptor IL-1; anticorpi monoclonali anti-IL-1 β ; anticorpi monoclonali anti-IL-6; factori de creștere; inhibitori elastază; compuși piridinil-imidazol; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorp anti-TNF α umanizat; Celltech/Bayer); cA2 (anticorp himeric anti-TNF α ; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 75 kD; Immunex; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295); *J.Invest:Med* (1996) Vol.44, 235A); 55 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 55 kD; Hoffmann-LaRoche); interleukin-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; agoniști IL-10 și/sau IL-4 (de exemplu, anticorpi agonist); interleukin-11; promedicamente glucoronid- sau dextran-conjugate ale prednisolin, dexametasonă sau budezonidă; oligodeoxi-nucleotide fosforotioat ICAM-1 antisens (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 complement solubil (TP10; T Cel Sciences, Inc.); mesalazină cu eliberare scăzută; metotraxat; antagoniști ai facotrului de activare a plachetului (PAF); ciprofloxacina; și lignocaină.

Exemple nelimitative de agenți terapeutici pentru scleroză multiplă cu care un anticorp, sau porțiune anticorp a invenției poate fi combinat include următoarele: corticosteroizi, prednisolin; metilprednisolon; azatioprin; ciclofosamidă; ciclosporină; metotrexat; 4-aminopiridină; tizanidină; interferon- β 1a (AvonexTM; Biogen); interferon- β 1b (BetaseronTM; Chiron/Berlex); Copolimer 1 (Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc); oxigen hiperbatic;



imunoglobulină intravenoasă; clabribin; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorp anti-TNF α umanizate; Celltech/Bayer); cA2(anticorp anti-TNF α himeric; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 75 kD; Immunex; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J.Invest.Med.* (1996) Vol.44, 235A); 55 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 55 kD; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; și agoniști IL-10 și/sau IL-4 (de exemplu, anticorpi agonist).

Exemple nelimitative de agenți terapeutici pentru sepsie cu care un anticorp, sau porțiune anticorp a invenției poate fi combinat include următoarele: soluții saline hipertonică; antibiotice; gamma globulină intravenoasă; hemofiltrare continuă: carbapeneme (de exemplu, meropenem); antagoniști de citokine precum TNF α , IL-1 β , IL-6 și/sau IL-8; CDP-571/CAY-10-3356 (anticorp anti-TNF α umanizat; Celltech/Bayer); cA2(anticorp anti-TNF α himeric; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 75 kD; Immunex; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J.Invest.Med.* (1996) Vol.44, 235A); 55 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 55 kD; Hoffmann-LaRoche); agenți de reglare citokină (CRA-uri) HO228 și HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (peptidă moleculară ușoară; SmithKline Beecham); guanilhidrazonă CNI-1493 tetravalentă (Picower Institute); factorul inhibitor al căii țesutului (TFPI; Chiron) PHP (hemoglobină modificată chimic; APEX Bioscience); chlaori de fier și chelați, care includ complex acid dietilentriamin pentaacetic-fier(III) (DTPA iron(III); Molichem Medicines); lizofilină (metilxantină sintetică cu moleculă mică; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-Glucan (β 1,3glucan solubil apos; Alpha-Beta Technology); apolipoproteină A-1 recosntituită cu lipide; acizi chiral hidroxamici (antibacterieni sintetici care inhibă biosinteza lipidei A); anticorpi anti-endotoxină; E5531 (antagonist sintetic lipidă A; Eisai America, Inc.); rBPI₁ (fragment recombinant N-terminal al proteinei umane de creștere bactericid/permeabilitate); și peptide sintetice anti-endotoxină (SAEP; BiosYnth Research Laboratories);



Exemple nelimitative de agenți terapeutici pentru sindromul bolii respiratorii la adult (ARDS) cu care un anticorp, sau porțiune anticorp a invenției poate fi combinată includ următoarele: anticorpi anti-IL-8; terapie de înlocuire agent de suprafață; CDP-571/BAY-10-3356 (anticorp anti-TNF α umanizat; Celltech/Bayer); cA2 (anticorp anti-TNF α himeric; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 75 kD; Immunex; vezi, de exemplu, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest.Med.* (1996) Vol.44, 235A); și 55kdTNFR-IgG (proteină de fuziune TNF receptor-IgG 55 kD; Hoffmann-LaRoche).

Utilizarea anticorpilor, sau porțiunilor anticorp ai invenției în combinație cu alți agenți terapeutici s-a discutat suplimentar în subsecțiunea IV.

Compozițiile farmaceutice ale invenției pot include o "cantitate eficientă terapeutic" sau o "cantitate eficientă profilactic" dintr-un anticorp sau porțiune anticorp a invenției. O "cantitate eficientă terapeutic" se referă la o cantitate eficientă, la dozaje și pentru perioade de timp necesare, pentru a obține rezultatul terapeutic dorit. O cantitate eficientă terapeutic a anticorpului sau porțiunii de anticorp poate varia conform factorilor cum ar fi starea de boală, vârstă, sex, și greutatea individului, și capacitatea anticorpului sau porțiunii anticorp de a provoca răspunsul dorit la individ. De asemenea, o cantitate eficientă terapeutic este una în care orice efecte toxice sau dăunătoare ale anticorpului sau porțiunii anticorp sunt depășite și sunt terapeutic benefice. O "cantitate eficientă profilactic" se referă la o cantitate eficientă, la dozaje și pentru perioade de timp necesare, pentru a atinge rezultatul profilactic dorit. De obicei, deoarece o doză profilactică se folosește la subiecți înainte sau la un stadiu mai timpuriu al bolii, cantitatea eficientă terapeutic va fi mai mică decât cantitatea eficientă terapeutic.

Regimurile de dozaj pot fi ajustate pentru a asigura răspunsul optim dorit (de exemplu, un răspuns terapeutic sau profilactic). De exemplu, poate fi administrat un singur bol



fi administrate câteva doze divizate în timp sau doza poate fi redusă sau crescută proporțional după cum este indicat de exigențele situației terapeutice. Este avantajos în mod special să se formuleze compoziții parenterale sub formă de doze unitate pentru ușurința administrării și uniformitatea dozajului. Forma de doză unitate așa cum s-a folosit aici se referă la unități fizice concrete potrivite ca doza unitare pentru tratarea subiecților mamifer; fiecare unitate conține o cantitate predeterminată a compusului activ calculată pentru a produce efectul terapeutic dorit în asociere cu purtătorul farmaceutic necesar. Descrierea pentru formele unitate dozată ale invenției sunt dictate de și direct dependent de (a) caracteristicile unice ale compusului activ și de efectul terapeutic și profilactic particular care trebuie atins, și (b) limitările inerente în domeniul compoundării cum ar fi un compus activ pentru tratamentul sensibilității la indivizi.

Un domeniu exemplificator, nelimitativ pentru o cantitate eficientă terapeutic și profilactic a unui anticorp sau porțiune de anticorp al invenției este 0,1-20 mg/kg, mai preferat 1-10 mg/kg. Este de remarcat că valorile dozajului pot varia cu tipul și severitatea condiției care trebuie ameliorată. Este de înțeles în plus că pentru orice subiect particular, regimurile specifice de dozaj vor fi ajustate în timp conform nevoii individuale și aprecierii profesionale a persoanei care administrează sau supervizează administrarea compozițiilor, și că domeniile de dozaj menționate aici sunt numai exemplificatoare și nu intenționează să limiteze întinderea sau practica compoziției revendicate.

IV. Utilizări ale anticorpilor invenției

Data fiind capacitatea lor de a se lega la hTNF α , anticorpilor anti-hTNF α , sau porțiuni ale acestora, ale invenției se pot folosi pentru a detecta hTNF α (de exemplu, într-o probă biologică cum ar fi ser sau plasmă), folosind un imunotest convențional, cum ar fi analizele enzimă legată la imunosorbent (ELISA).



radioimunotest (RIA) sau imunohistochimia țesutului. Invenția asigură o metodă pentru detectarea hTNF α într-o probă biologică cuprinzând contactarea unei probe biologice cu un anticorp, sau porțiune de anticorp, a invenției și detectarea fie a anticorpului (sau porțiunii anticorp) legat la hTNF α sau anticorp nelegat (sau porțiune de anticorp), prin aceasta detectând hTNF α într-o probă biologică. Anticorpul este direct sau indirect marcat cu o substanță detectabilă pentru a facilita detectarea anticorpului legat sau nelegat. Substanțe detectabile adecvate includ diverse enzime, grupări prostetice, materiale fluorescente, materiale luminescente și materiale radioactive. Exemple de enzime corespunzătoare includ peroxidază de la hrean, fosfatază alcalină, β -galactozidază, sau acetilcolinesterază; exemple de complexe de grupări prostetice corespunzătoare includ streptavidină/biotină și avidină/biotină; exemple de materiale fluorescente corespunzătoare includ umbelliferonă, fluoresceină, izotiocianat de fluoresceină, rodamină, diclorotriazinilamină, fluoresceină, clorură de dansil sau ficoeritrina; un exemplu de material luminescent include luminolul; și exemple de material radioactiv corespunzător include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S sau ^3H .

Alternativ la marcarea anticorpului, hTNF α poate fi cercetat în fluide biologice printr-un imunotest de competiție folosind standarde rhTNF α marcate cu o substanță detectabilă și un anticorp anti-hTNF α nemarcat. În această analiză, proba biologică, standardele rhTNF α marcate și anticorpul anti-hTNF α sunt combinate și se determină cantitatea de standard rhTNF α legată la anticorpul nemarcat. Cantitatea de hTNF α dintr-o probă biologică este invers proporțională cantității de standard rhTNF α marcat legată la anticorp anti-hTNF α .

Anticorpul D2E7 al invenției se poate folosi de asemenea pentru detectarea TNF α de la alte specii decât oameni, în special TNF α de la primate (de exemplu, cimpanzeu, babuin, sanguin, cynomolgus și rhesus), porc și șoarece, deoarece D2E7 se poate lega la fiecare dintre aceste TNF α (cum s-a discutat suplimentar în Exemplul 4, subsecțiunea E).



Anticorpul și porțiunile anticorp ale invenției sunt capabile să neutralizeze activitatea hTNF α atât *in vitro* cât și *in vivo* (vezi Exemplul 4). Mai mult, cel puțin unii dintre anticorpul invenției, cum ar fi D2E7, pot neutraliza activitatea TNF α de la alte specii. În conformitate anticorpul și porțiunile anticorp ale invenției pot fi folosite pentru inhibarea activității TNF α , de exemplu într-o cultură de celule care conține hTNF α , la subiecți umani sau alți subiecți mamiferi care au TNF α cu care anticorpul invenției reacționează încrucișat (de exemplu, cimpanzeu, babuin, sanguin, cynomolgus și rhesus, porc sau șoarece). Într-o realizare, invenția asigură o metodă pentru inhibarea activității TNF α cuprinzând contactarea TNF α cu un anticorp sau porțiune anticorp a invenției astfel încât activitatea TNF α este inhibată. De preferință TNF α este TNF α uman. De exemplu, într-o cultură de celule care conține, sau este suspectată că ar conține hTNF α , se poate adăuga un anticorp sau porțiune anticorp a invenției la mediul de cultură pentru a inhiba activitatea a hTNF α din cultură.

În altă realizare, invenția asigură o metodă pentru inhibarea activității TNF α la un subiect care suferă de o tulburare în care activitatea TNF α este dăunătoare. TNF α a fost implicat în patofiziologia unei game largi de tulburări (vezi de exemplu, Moeller, A., et al. (1990) *Citokine* 2:162-169; brevet SUA 5.231.024 pentru Moeller et al.; publicația de brevet european 260 610 de Moeller, A.). Invenția asigură metode pentru activitatea TNF α la un subiect care suferă de o astfel de tulburare, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unui anticorp sau porțiune anticorp a invenției astfel că activitatea TNF α din subiect este inhibată. De preferință, TNF α este uman și subiectul este un subiect uman. Alternativ, subiectul poate fi un mamifer care exprimă un TNF α cu care un anticorp al invenției reacționează încrucișat. Încă, în plus, subiectul poate fi un mamifer în care s-a introdus hTNF α (de exemplu, prin administrarea hTNF α sau prin expresia unei transgene hTNF α). Un anticorp al invenției poate fi administrat la un subiect

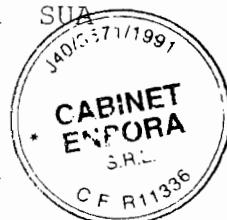


pentru scopuri terapeutice (discute suplimentar mai jos). Mai mult, un anticorp al invenției poate fi administrat la un mamifer care nu este om care exprimă un TNF α cu care anticorpul reacționează încrucișat (de exemplu, o primată, porc sau șoarece) pentru scopuri veterinare sau ca un model animal al bolii umane. Cu privire la cele din urmă, astfel de modele animale pot fi utile pentru evaluarea eficacității terapeutice a anticorpilor invenției (de exemplu, prin testarea dozajelor și duratelor de timp pentru administrare).

Așa cum s-a folosit aici, termenul "o tulburare în care activitatea TNF α este dăunătoare" intenționează să includă boli și alte tulburări în care prezența TNF α într-un subiect care suferă de tulburare s-a dovedit a fi sau este suspectată ca fiind responsabilă pentru patofiziologia tulburării sau un factor care contribuie la o înrăutățire a tulburării. În conformitate, o tulburare în care activitatea TNF α este dăunătoare este o tulburare în care inhibarea activității TNF α este așteptată să amelioreze simptomele și progresul tulburării. Asemenea tulburări pot fi evidențiate, de exemplu, printr-o creștere în concentrația de TNF α într-un fluid biologic al subiectului care suferă de tulburare (de exemplu, o creștere în concentrația de TNF α în ser, plasmă, fluid sinovial, etc. al subiectului), care se poate detecta de exemplu, folosind un anticorp anti-TNF α cum s-a descris mai sus. Există numeroase exemple de tulburări în care activitatea TNF α este dăunătoare. Utilizarea anticorpilor sau porțiunilor de anticorp ale invenției în tratamentul tulburărilor specifice este discutat suplimentar mai jos:

A. Sepsie

Factorul necrozei tumorii are un rol stabilit în patofiziologia sepsiei, cu efecte biologice care includ hipotensiune, supresie miocardică, sindrom de scurgere vasculară, necroza organelor, stimularea eliberării mediatorilor toxici secundari și activarea cascadei coagulării (vezi, de exemplu, Moeller, a., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; brevet SUA



5.231.024 et al.; publicația de brevet european 260 610 B1 de Moeller, A.; Tracey, K.J. și Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; russel, D și Thompson, R.C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721). În conformitate, anticorpul uman și porțiunile de anticorp, ale invenției se pot folosi pentru tratarea sepsiei în oricare dintre manifestările sale clinice, incluzând șoc septic, șoc endotoxic, sepsie gram negativă și sindromul șocului toxic.

În plus, pentru tratarea sepsiei, un anticorp anti-hTNF α , o porțiune de anticorp, a invenției se poate coadministra cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari care pot ameliora suplimentar sepsia, cum ar fi un inhibitor interleukină-1 (precum cei descriși în publicațiile PCT WO 92/16221 și WO 92/17583), citokina interleukină-6 (vezi, de exemplu, publicația PCT WO 93/11793) sau un antagonist al factorului de activare plachetară (vezi, de exemplu, publicația cererii de brevet european EP 374 510). Alte terapii combinate pentru tratamentul sepsiei sunt discutate suplimentar în subsecțiunea III.

Suplimentar, într-o realizare preferată, un anticorp anti-hTNF α sau porțiune de anticorp a invenției se administrează la un subiect uman într-un subgrup de pacienți cu sepsie care au o concentrație în ser sau plasmă de IL-6 de peste 500 pg/ml, și mai preferat 1000 pg/ml, la momentul tratamentului (vezi, publicația PCT WO 95/20978 de Daum, L., et al.).

B. Boli autoimune

Factorul necrozei tumorii a fost implicat ca jucând un rol în patofiziologia unei diversități de boli autoimune. De exemplu, TNF α a fost implicat în activarea inflamării țesutului care produce distrugerea articulației în artrita reumatoidă (vezi, de exemplu, Moeller, A. et al., (1990) *Cytokine* 2:162-169; brevet SUA 5.231.024 de Moeller et al.; publicația brevetului european 260.610 B1 de Moeller, A.; Tracey și Cerami, *supra*; Arend, W.O. și Dayer, J-M. (1995) *Arth.RHeum*, 38:151-160; Fava, R.A., et



al.(1993) *Clin.Exp.Immunol.* 94:261-266). De asemenea, TNF α a fost implicat în promovarea morții celulelor insulei și în medierea diabetului rezistent la insulină (vezi, de exemplu, Tracey și Cerami, *supra*; publicație PCT WO 94/08609). De asemenea, TNF α a fost implicat în medierea citotoxicității față de oligodendrocite și inducerea plăcii inflamatorii în scleroza multiplă (vezi, de exemplu, Tracey și Cerami, *supra*). Anticorpi himerici și umanizați murin anti-hTNF α au fost supuși testării clinice pentru tratamentul artritei reumatoide (vezi, de exemplu, Elliott, M.J., et al.(1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliott, M.J., et al.(1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E.C., et al.(1995) *Br.J.Rheumatol.* 34:334-342).

Anticorpi umani și porțiuni de anticorp ale invenției pot fi folosite pentru tratarea bolilor autoimune, în special a celor asociate cu inflamație, incluzând artrita reumatoidă, spondilita reumatoidă, osteoartrita și artrita gutoasă, alergii, scleroză multiplă, diabet autoimun, uveită autoimună și sindrom nefrotic. De obicei, anticorpul sau porțiunea de anticorp, se administrează sistemic, deși pentru anumite tulburări, administrarea locală a anticorpului sau porțiunii de anticorp la un sit al inflamației poate fi benefică (administrare locală în articulații în artrita reumatoidă sau aplicare topică la ulcere diabetice, singur sau în combinație cu un derivat ciclohexan-iliden cum s-a descris în publicația PCT WO 93/19751). Un anticorp, sau porțiune de anticorp a invenției se poate administra cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari utili în tratamentul autoimune, cum s-a discutat suplimentar în subsecțiunea III.

C. Boli infecțioase

Factorul necrozei tumorii a fost implicat în medierea efectelor biologice observate într-o diversitate de boli infecțioase. De exemplu, TNF α a fost implicat în medierea inflamării creierului și trombozei capilare și infarctului în malarie. De asemenea, hTNF α a fost implicat în medierea inflamării creierului, inducerea distrugerii barierei sângere



creier, declanșarea sindromului de șoc septic și activarea infarctului venos în meningită. De asemenea, TNF α a fost implicat în inducerea cașexiei, stimularea proliferării virale și medierea lezării sistemului nervos central în sindromul deficienței imune dobândite (SIDA). În conformitate, anticorpul și porțiunile anticorp ale invenției se pot folosi în tratamentul bolilor infecțioase, incluzând meningita bacteriană (de exemplu, publicația de brevet european EP 585 705), malaria cerebrală, SIDA și complexul legat de SIDA (ARC) (vezi, de exemplu, publicația cererii de brevet european EP 230 574), precum și infecția citomegalovirus secundară transplantării (vezi, de exemplu, Fietze, E., et al. (1994) *Transplantation* 58:675-680). Anticorpul și porțiunile anticorp ale invenției se pot folosi pentru a ameliora simptomele asociate cu boli infecțioase, incluzând febră și mialgie datorită infecției (ca influența) și cașexia secundară infecției (de exemplu, secundară la SIDA sau ARC).

D. Transplantare

Factorul necrozei tumorii a fost implicat ca un mediator cheie al respingerii allogrefei și boala gazdei față de grefă (GVHD) și în medierea unei reacții adverse care s-a observat când anticorpul OKT3 de șobolan, îndreptat împotriva complexului celulă T receptor CD3, se folosește pentru a inhiba respingerea transplanturilor renale (vezi, de exemplu, Eason, J.D., et al. (1995) *Transplantarea* 59:300-305; Suthanthiran, M. și Strom, T.B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:365-375). În conformitate, anticorpul și porțiunile anticorp ale invenției se pot folosi pentru inhibarea respingerii transplantului, inclusiv respingerile allogrefelor și xenogrefelor și pentru inhibarea GVHD. Deși anticorpul sau porțiunea anticorp poate fi folosită singură, mai preferat se folosește în combinație cu unul sau mai mulți alți agenți care inhibă răspunsul imun împotriva allogrefei sau inhibă GVHD. De exemplu, într-o realizare, un anticorp sau porțiune anticorp a invenției se folosește în combinație cu OKT3



pentru a inhiba reacțiile induse OKT3. În altă realizare, un anticorp sau porțiune anticorp a invenției se folosește în combinație cu unul sau mai mulți anticorpi dirijați la alte ținte implicate în reglarea răspunsurilor imune, cum ar fi moleculele suprafeței celulei CD25 (receptorul- α interleukină-2), CD11a(LFA-1), CD8 α (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-I) și/sau CD86(B7-2). În încă altă realizare, un anticorp sau porțiune anticorp a invenției se folosește în combinație cu unul sau mai mulți agenți imunosupresivi generali, cum ar fi ciclosporina A sa FK506.

E. Malignitate

Factorul necrozei tumorii a fost implicat în inducerea cașexiei, stimularea creșterii tumorii, intensificarea potențialului metastatic și medierea citotoxicității în malignități. În conformitate, anticorpii și porțiuni anticorp ale invenției, se pot folosi în tratamentul malignităților, pentru inhibarea creșterii tumorii sau metastazelor și/sau pentru ameliorarea cașexiei secundare malignității. Anticorpul sau porțiunea anticorp se poate administra sistemic sau local la locul tumorii.

F. Tulburări pulmonare

Factorul necrozei tumorii a fost implicat în patofiziologia sindromului insuficienței respiratorii la adult (ARDS), incluzând stimularea activării leucocită-endotelială, dirijind citotoxicitatea spre pneumocite și inducând sindromul scurgerii vasculare. În conformitate, anticorpii și porțiunile anticorp ale invenției pot fi folosite pentru a trata diverse tulburări pulmonare, incluzând sindromul insuficienței respiratorii la adult (vezi, de exemplu, publicația PCT WO 91/04054), șoc pulmonar, boală inflamatorie pulmonară, sarcoidoză pulmonară, fibroză pulmonară și silicoză. Anticorpul sau porțiunea anticorp poate fi administrată sistemic sau local la suprafața plămânului, de exemplu, ca un aerosol. Un anticorp sau porțiune anticorp



invenției se poate administra de asemenea cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari utili în tratamentul tulburărilor pulmonare, cum s-a discutat suplimentar în subsecțiunea III.

G. Tulburări intestinale

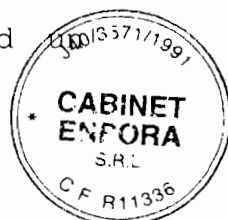
Factorul necrozei tumorii a fost implicat în patofiziologia tulburărilor inflamatorii ale intestinului (vezi, de exemplu, Tracy, K.J., et al. (1986) *Science* 234:470-474; Sun, X-M., et al. (1988) *J.Clin.Invest.* 81:1328-1331; MacDonald, T. T., et al., (1990) *Clin.Exp.Immunol.* 81:301-305). Anticorpi himerici murini anti-hTNF α au fost supuși testării clinice pentru tratamentul bolii lui Crohn (van Dullemen, H.E., et al. (1995) *Gastroenterology* 109:129-135). Anticorpi umani și porțiuni anticorp ale invenției, se pot folosi de asemenea, pentru tratarea tulburărilor intestinale, cum ar fi boala idiopatică inflamatorie a intestinului, care include 2 sindromuri, boala lui Crohn și colita ulcerativă. Un anticorp sau porțiune anticorp a invenției poate fi administrată de asemenea cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari utili în tratamentul tulburărilor intestinale, cum s-a discutat suplimentar în subsecțiunea III.

H. Tulburări cardiace

Anticorpii și porțiunile anticorp ale invenției pot fi folosite de asemenea pentru tratarea diverselor tulburări cardiace, incluzând ischemia inimii (vezi, de exemplu, publicația cererii de brevet european EP 453 898) și insuficiența inimii (slăbirea mușchiului inimii) (vezi, de exemplu, publicația PCT WO 94/20139).

I. Altele

Anticorpii și porțiunile anticorp ale invenției se pot folosi de asemenea, pentru tratarea altor diverse tulburări în care activitatea TNF α este dăunătoare. Exemple de alte boli și tulburări în care a fost implicată activitatea TNF α în patofiziologie și care, astfel pot fi tratate folosind



anticorp sau porțiune anticorp a invenției includ tulburări inflamatorii ale osului și resorbției osoase (vezi, de exemplu, Bertolini, D.R., et al. (1986) *Nature* 319:516-518; König, A., et al., (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627; Lerner, U.H., și Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8:147-155; și Shankar, G. și Stern, P.H. (1993) *Bone* 14:71-876), hepatite, incluzând hepatite alcoolice (vezi, de exemplu, McClain, C.J. și Cohen, D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351; Felver, M.E. et al. (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14:255-259; și Hansen, J., et al. (1994) *Hepatology* 20:461-474) hepatite virale (Sheron, N., et al. (1991) *J. Hepatol.* 12:241-245; și Hussain, M.J., et al. (1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115 (și hepatite explozive; tulburări de coagulare (vezi, de exemplu, van der Poll, T., et al. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; și van der Poll, T., et al. (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60), arsuri (vezi, de exemplu, Giroir, B.P., et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124; și Liu, X.S., et al. (1994) *Burns* 20:40-44), leziune de reperfuzare (vezi, de exemplu, Scales, W.E., et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267:G1122-1127; Serrick, C., et al. (1994) *Transplantation* 58:1158-1162; și Yao, Y.M., et al. (1995) *Resuscitation* 29:157-168), formarea cheloidului (vezi, de exemplu, McCauley, R.L., et al. (1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308), formarea cicatricei țesutului; febra; tulburare periodontală; obezitate și toxicitate de iradiere.

Această invenție este ilustrată suplimentar prin exemplele care urmează care nu vor fi interpretate ca limitative. Conținuturile tuturor referințelor, brevetelor și cererilor de brevet publicate citate în această cerere sunt încorporate aici ca referințe.

EXEMPLUL 1: Analiza cineticii legării anticorpilor umani la hTNF α

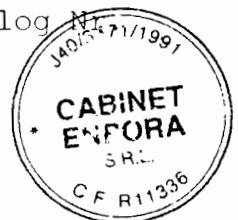
Interacțiunile de legare în timp real dintre ligand (TNF α uman recombinant biotinilat (rhTNF α) imobilizat pe o matrice



biosenzor) și analit (anticorpul în soluție) s-au măsurat prin rezonanța suprafeței plasmonului (SPR) folosind sistemul BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Sistemul utilizează proprietățile optice ale SPR pentru a detecta alterări în concentrațiile proteinei într-o matrice dextran biosenzor. Proteinele sunt legate covalent la matricea dextran la concentrații cunoscute. Anticorpul este injectat în matricea dextran și între anticorpul injectat care se leagă în mod specific și ligandul imobilizat rezultă o creștere a concentrației proteinei din matrice și schimbarea rezultă în semnalul SPR. Aceste schimbări în semnalul SPR sunt înregistrate ca unități de rezonanță (RU) și sunt afișate față de timp de-a lungul axei y ale unei senzograme.

Pentru a facilita imobilizarea rhTNF α pe o matrice biosenzor, streptavidina este legată covalent prin intermediul grupărilor amină libere la matricea dextran activând mai întâi grupările carboxil pe matrice cu 100 mM N-hidroxisuccinimidă (NHS) și 400 mM clorhidrat de N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)-carbodiimidă (EDC). În continuare, streptavidina se injectează prin matricea activată. Se injectează 35 μ l streptavidină (25 μ g/ml) diluată în acetat de sodiu, pH 4,5 în biosenzorul activat și aminele libere de pe proteină sunt legate direct la grupările carboxil activate. Esterii EDC ai matricei nereacționați sunt dezactivați printr-o injecție cu 1 M etanolamină. Fragmente biosenzor cuplat streptavidină sunt de asemenea accesibile comercial (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia biosensor, Piscataway, NJ).

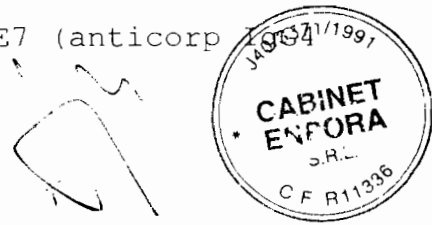
S-a preparat rhTNF α biotinilat dizolvând mai întâi 50 mg biotină (esterul acidului D-biotinil- ϵ -aminocaproic N-hidroxisuccinimidă; Boehringer Mannheim Cat. No. 1008 960) în 500 μ l dimetilsulfoxid pentru a obține o soluție 10 mg/ml. S-au adăugat 10 μ l biotină per ml rhTNF α (la 2,65 mg/ml) pentru un raport molar 2:1 biotină față de rhTNF α . Reacția s-a amestecat cu grijă și s-a incubat 2 ore în întuneric la temperatura camerei. S-a echilibrat o coloană PD-10, Sephadex G-25M (Pharmacia Catalog N



17-0851-01) cu 25 ml PBS rece și s-a încărcat cu 2 ml rhTNF α -biotină per coloană. Coloana s-a eluat cu 10x1 ml PBS rece. Fraakțiile s-au colectat și s-au citit la OD280 (1,0 OD=1,25 mg/ml). Fraakțiile corespunzătoare s-au strâns și s-au depozitat la -80°C până la utilizare. De asemenea, rhTNF α biotinilat este accesibil comercial (R&D Systems Catalog Nr.FTA00, Minneapolis, MN).

Pentru a fi imobilizat rhTNF α biotinilat pe matrice prin intermediul streptavidinei s-a diluat în tampon de migrare PBS (Gibco Cat.Nr. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY) suplimentat cu 0,05% surfactant (BIAcore) P20 (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Pentru a determina capacitatea anticorpilor specifici rhTNF α de a lega rhTNF α imobilizat, s-a dirijat un test de legare după cum urmează: s-au injectat alicote de rhTNF α biotinilat (25 nM; alicote 10 μ l) prin matricea dextran cuplată streptavidină la o rată de curegere de 5 μ l/minut. Înaintea injectării proteinei și imediat după s-a trecut un curent de tampon PBS prin fiecare celulă de curgere. Diferența netă în semnal între linia de bază și aproximativ 30 secunde după completarea injectării rhTNF α biotinilat s-a considerat a reprezenta valoarea legării (aproximativ 500 RU). S-a măsurat legarea directă anticorp specific rhTNF α la rhTNF α imobilizat biotinilat. S-au diluat anticorpi (20 μ g/ml) în tampon de migrare PBS și s-au injectat alicote de 25 μ l în matricele de proteină imobilizată la o rată de curgere de 5 μ l/minut. Înaintea injectării anticorpului și imediat după s-a trecut un flux de PBS prin fiecare celulă de curgere. Diferența netă în semnalul liniei de bază și semnalul după completarea injectării anticorp s-a considerat a reprezenta valoarea de legare a probei particulare. S-au regenerat matricile biosenzor folosind 100 mM HCl înaintea injectării probei următoare. Pentru determinarea ratei de detașare (K_{off}) pe rata de atașare (K_{on}) s-a folosit software-ul de evaluare cinetică BIAcore (versiunea 2.1) a constantelor ratei de asociere (K_a) și ratei de disociere (K_d).

Rezultatele reprezentative ale legării D2E7 (anticorp



de lungime întreagă) la rhTNF α biotinilat, cum s-a comparat la mAb de șoarece MAK 195 (fragment F(ab')₂) sunt prezentate mai jos în Tabelul 1.

Tabelul 1: Legarea D2E7 IgG4 sau MAK 195 la rhTNF α biotinilat

Anticorp	[Ab], nM	rhTNF α , legat, RU	Ab, legat, RU	rhTNF α /Ab	K _{off} , sec ⁻¹ , (Avg)
D2E7	267	373	1215	1,14	8,45x10 ⁻⁵
	133	420	1569	1,30	5,42x10 ⁻⁵
	67	434	1633	1,31	4,75x10 ⁻⁵
	33	450	1532	1,19	4,46x10 ⁻⁵
	17	460	1296	0,98	3,47x10 ⁻⁵
	8	486	936	0,67	2,63x10 ⁻⁵
	4	489	536	0,38	2,17x10 ⁻⁵
	2	470	244	0,18	3,68x10 ⁻⁵
					(4,38x10 ⁻⁵)
MAK 195	400	375	881	1,20	5,38x10 ⁻⁵
	200	400	1080	1,38	4,54x10 ⁻⁵
	100	419	1141	1,39	3,54x10 ⁻⁵
	50	427	1106	1,32	3,67x10 ⁻⁵
	25	446	957	1,09	4,41x10 ⁻⁵
	13	464	708	0,78	3,66x10 ⁻⁵
	6	474	433	0,47	7,37x10 ⁻⁵
	3	451	231	0,26	6,95x10 ⁻⁵
					(4,94x10 ⁻⁵)

În a doua serie de experimente dintre un IgG1 formă de lungime întreagă a D2E7 și rhTNF s-a analizat cantitativ folosind tehnologia BIAcore și s-au derivat constantele ratei cinetice și s-au rezumat mai jos în Tabelele 2, 3 și 4.

Tabelul 2: Constantele ratei de disociere aparentă a



interacțiunii dintre D2E7 și rhTNF biotinilat

<u>Experiment</u>	$K_d (s^{-1})$
1	$9,58 \times 10^{-5}$
2	$9,26 \times 10^{-5}$
3	$7,60 \times 10^{-5}$
Medie	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$

Tabel 3: Constantele ratei de asociere aparentă dintre D2E7 și rhTNF biotinilat

<u>Experiment</u>	$K_a (M^{-1}, s^{-1})$
1	$1,33 \times 10^5$
2	$1,05 \times 10^5$
3	$3,36 \times 10^5$
Medie	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$

Tabel 4: Rata cinetică aparentă și constantele afinității D2E7 și rhTNF

<u>Experiment</u>	$K_a (M^{-1}, s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_d (M)$
1	$1,33 \times 10^5$	$9,58 \times 10^{-5}$	$7,20 \times 10^{-10}$
2	$1,05 \times 10^5$	$9,26 \times 10^{-5}$	$8,82 \times 10^{-10}$
3	$3,36 \times 10^5$	$7,60 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-10}$
Medie	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$	$6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10}$

Constantele ratei de disociere și asociere s-au calculat prin analiza regiunilor disocierii și asocierii a senzogramelor prin software-ul analizei BIA. S-au asumat cineticile reacției chimice convenționale pentru interacțiunea dintre D2E7 și molecula rhTNF: cinetici o disociere de ordinul 0 și asociere de ordinul 1. Pentru analiză, s-a considerat numai interacțiunea dintre un braț al anticorpului bivalent D2E7 și o unitate a rhTNF biotinilat trimeric în alegerea modelelor moleculare pentru analiza datelor cinetice. S-au realizat 3 experimente independente și rezultatele s-au analizat separat. Media constantei ratei disocierii aparente dintre D2E7 și rhTNF biotinilat a fost $8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5} s^{-1}$ și media

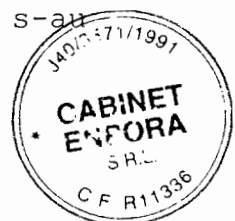


constantei ratei asocierii aparente, k_a a fost $1,91 \pm 1,26 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$. Constanta disocierii intrinsece aparente (K_d) a fost calculată apoi prin formula: $K_d = k_d / k_a$. Astfel, media K_d a anticorpului D2E7 pentru rhTNF derivată de la parametrii cinetici a fost $6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10} M$. Diferențele minore în valorile cinetice pentru forma IgG1 a D2E7 (prezentate în Tabelele 2, 3 și 4) și forma IgG4 a D2E7 (prezentată în Tabelul 1 și Exemplele 2 și 3) nu sunt considerate a fi diferențe reale care rezultă din prezența regiunilor constante fie IgG1, fie IgG4, ci mai degrabă sunt considerate ca putând fi atribuite măsurătorilor concentrației anticorp mai precise folosite pentru analiza cineticii IgG1. În conformitate, valorile cineticii pentru forma IgG1 a D2E7 prezentate aici sunt considerate a fi parametrii cei mai preciși pentru anticorpul D2E7.

EXEMPLUL 2: Scanarea mutagenezei alaninei a domeniilor CDR3 D2E7

S-au introdus o serie de mutații alanină singulare prin metode standard alături de domeniul CDR3 al regiunilor D2E7 VL și D2E7 VH. Mutațiile catenei ușoare sunt ilustrate în Figura B (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 și LD2E7*.A8, având o mutație alanină la poziția 1, 3, 4, 5, 7, sau respectiv 8 ale domeniului D2E7 VL CDR3). Mutațiile catenei grele sunt ilustrate în Figura 2B (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 și HD2E7*.A9, având o mutație alanină la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau respectiv, 11 a domeniului D2E7 VH CDR3). Cineticile interacțiunii rhTNF α cu un anticorp compus al tipului sălbatic D2E7 VL și VH s-au comparat cu cele ale anticorpilor compuși din 1) un tip sălbatic D2E7 VL împerecheat cu D2E7 VH cu o alanină substituită; 2) un D2E7 VH de tip sălbatic împerecheat cu D2E7 VL cu o alanină substituită; sau 3) D2E7 VL cu alanină substituită împerecheat cu un D2E7 VH alanină substituită. Toți anticorpii s-au testat ca molecule IgG4 de lungime întreagă.

Cineticile interacțiunii anticorpilor cu rhTNF α s-au

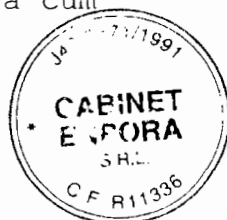


determinat prin rezonanța suprafeței plasmonului cum s-a descris în Exemplul 1. Ratele detașării K_{off} pentru diferite perechi VH/VL sunt rezumate mai jos în Tabelul 5:

Tabelul 5: Legarea mutantelor D2E7 scan-alanină la rhTNF α biotinilat

<u>VH</u>	<u>VL</u>	<u>$K_{off}(\text{sec}^{-1})$</u>
D2E7 VH	D2E7 VL	$9,65 \times 10^{-5}$
HD2E7*.A1	D2E7 VL	$1,4 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A2	D2E7 VL	$4,6 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A3	D2E7 VL	$8,15 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A4	D2E7 VL	$1,8 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A5	D2E7 VL	$2,35 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A6	D2E7 VL	$2,9 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A7	D2E7 VL	$1,0 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A8	D2E7 VL	$3,1 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	D2E7 VL	$8,1 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A1	$6,6 \times 10^{-5}$
D2E7 VH	LD2E7*.A3	NETECTABIL
D2E7 VH	LD2E7*.A4	$1,75 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A5	$1,8 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A7	$1,4 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A8	$3,65 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	$1,05 \times 10^{-4}$

Aceste rezultate demonstrează că majoritatea pozițiilor domeniilor CDR3 ale regiunii D2E7 VL și regiunii VH sunt favorabile substituției cu un singur rest alanină. Substituție unei singure alanine la poziția 1, 4, 5 sau 7 a domeniului CDR3 al D2E7 VH sau la poziția 2, 5, 6, 8, 9, sau 10 ale domeniului CDR3 al D2E7 VH nu afectează semnificativ legarea hTNF α așa cum



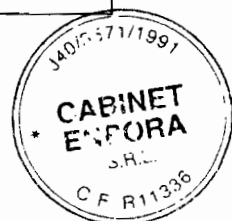
s-a comparat la anticorpul D2E7 parental de tip sălbatic. Substituția alaninei la poziția 8 a D2E7 VL CDR3 sau la poziția 3 a D2E7 VH CDR3 dă K_{off} de 4 ori mai rapidă și o substituție alanină la poziția 4 sau 11 a D2E7 VH CDR3 dă K_{off} de 8 ori mai rapidă, arătând că aceste poziții sunt mai critice pentru legare la hTNF α . Totuși, o singură substituție alanină la poziția 1, 4, 5, 7, sau 8 a domeniului CDR3 al D2E7 VL sau la poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, sau 11 a domeniului CDR3 al D2E7 VH rezultă încă într-un anticorp anti-hTNF α care are K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ sau mai mic.

EXEMPLUL 3: Analiza legării anticorpilor înrudiți D2E7

O serie de anticorpi înrudiți în secvență la D2E7 s-au analizat pentru legarea lor la rhTNF α , așa cum s-a comparat cu D2E7, prin rezonanța suprafeței plasmonului cum s-a descris în Exemplul 1. Secvențele aminoacide ale regiunilor VL testate sunt prezentate în Figurile 1A și 1B. Secvențele aminoacide ale regiunilor VH testate sunt prezentate în Figurile 2A și 2B. Ratele K_{off} pentru diverse perechi VH/VL (în formatul indicat fie ca anticorp de lungime integrală IgG1 sau IgG4, fie ca scFv) sunt rezumate mai jos în Tabelul 6.

Tabelul 6: Legarea anticorpilor D2E7 legați la rhTNF α biotinilați

VH	VL	Format	$K_{off}(\text{sec}^{-1})$
D2E7 VH	D2E7 VL	IgG1/IgG4	$9,65 \times 10^{-5}$
VH1-D2	LOE7	IGG1/IGG4	$7,7 \times 10^{-5}$
VH1-D2	LOE7	scFv	$4,6 \times 10^{-4}$
VH1-D2.N	LOE7.T	IGG4	$2,1 \times 10^{-5}$
VH1-D2.Y	LOE7.A	IGG4	$2,7 \times 10^{-5}$
VH1-D2.N	LOE7.A	IGG4	$3,2 \times 10^{-5}$
VH1-D2	EP B12	scFv	$8,0 \times 10^{-4}$
VH1-D2	2SD4 VL	scFv	$1,94 \times 10^{-3}$
3C-H2	LOE7	scFv	$1,5 \times 10^{-2}$



2SD4 VH	LOE7	scFv	$6,07 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	$1,37 \times 10^{-2}$
VH1A11	2SD4 VL	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
VH1B12	2SD4 VL	scFv	$1,01 \times 10^{-2}$
VH1B11	2SD4 VL	scFv	$9,8 \times 10^{-3}$
VH1E4	2SD4 VL	scFv	$1,59 \times 10^{-2}$
VH1F6	2SD4 VL	scFv	$2,29 \times 10^{-2}$
VH1D8	2SD4 VL	scFv	$9,5 \times 10^{-3}$
VH1G1	2SD4 VL	scFv	$2,14 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	EP B12	scFv	$6,7 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL10E4	scFv	$9,6 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL100A9	scFv	$1,33 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL100D2	scFv	$1,41 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL10F4	scFv	$1,11 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0E5	scFv	$1,16 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0F9	scFv	$6,09 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VLL0F10	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0G7	scFv	$1,56 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0G9	scFv	$1,46 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0H1	scFv	$1,17 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLL0H10	scFv	$1,12 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1B7	scFv	$1,3 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C1	scFv	$1,36 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLC7	scFv	$2,0 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1F4	scFv	$1,76 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1H8	scFv	$1,14 \times 10^{-2}$

Ratele lente (adică, $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$) pentru anticorpi de lungime întreagă (adică, format IgG) având un VL selectat de la D2E7, LOE7, LOE7.E și LOE7.A, care au fie o treonină, fie o alanină la poziția 9, arată că poziția 9 a CDR3 D2E7 VL poate fi ocupată de oricare dintre aceste două resturi fără afectarea substanțială a K_{off} . În conformitate, un motiv consens pentru CDR3 D2E7 VL cuprinde secvența aminoacidă: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ



ID NR:3). Mai mult, (adică, $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$) pentru anticorpi care au un VH selectat de la D2E7, VH1-D2E7.N și VH1-D2E7.Y, care au fie o tirozină, fie o asparagină la poziția 12, arată că poziția 12 a CDR3 D2E7 VH poate fi ocupată de oricare dintre aceste 2 resturi fără a afecta substanțial K_{off} . În conformitate, un motiv consens pentru CDR3 D2E7 VH cuprinde secvența aminoacidă: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D(Y/N) (SEQ ID NR:4).

Rezultatele prezentate în Tabelul 6 demonstrează că, anticorpilor care conțin regiunea 2SD4 VL sau VH CDR3 prezintă K_{off} mai rapidă (adică $K_{off} > 1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$) cum s-a comparat la anticorpilor care conțin regiunea D2E7 VL sau VH CDR3. În VL CDR3, 2SD4 diferă de D2E7 la pozițiile 2, 5 și 9. Așa cum s-a discutat mai sus, totuși, poziția 9 poate fi ocupată de Ala (ca în 2SD4) sau Thr (ca în D2E7) fără afectarea substanțială a K_{off} . Astfel, prin comparația 2SD4 și D2E7, pozițiile 2 și 5 ale D2E7 VL CDR3, ambele arginine, pot fi indicate ca fiind critice pentru asocierea anticorpului cu hTNF α . Aceste reziduuri ar putea fi direct implicate ca resturi de contact în situl de legare anticorp sau ar putea contribui critic la menținerea arhitecturii scheletului moleculei de anticorp în această regiune. Considerând importanța poziției 2, înlocuirea Arg (în LOE7, care are aceiași VL CDR3 ca D2E7) cu Lys (în EP B12) accelerează rata detașării prin factorul 2. Considerând importanța poziției 5, înlocuirea Arg (în D2E7) cu Ala (în LD2E7*.A5), cum s-a descris în Exemplul 2, de asemenea accelerează rata detașării de 2 ori. Mai mult, fără Arg la pozițiile 2 și 5 (în 2SD4), rata detașării este de 5 ori mai rapidă. Cu toate acestea, ar fi de remarcat că deși poziția 2 este importantă pentru îmbunătățirea legării la hTNF α , o schimbare la această poziție poate fi negată prin schimbări la alte poziții, așa cum s-a observat în VLLOE4, VLLOH1 sau VL0.1H8.

În VH CDR3, 2SD4 diferă de D2E7 la pozițiile 1, 7 și 12. Așa cum s-a discutat mai sus, totuși poziția 12 poate fi ocupată prin Asn (ca în 2SD4) sau Tyr (ca în D2E7) fără afectarea substanțială a K_{off} . Astfel, în comparația a 2SD4 și D2E7, pozițiile 1 și 7 ale D2E7 VH CDR3 pot fi identificate ca fiind critice pentru lega-



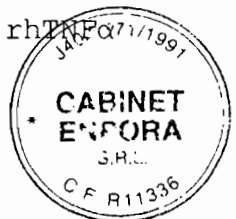
la hTNF α . Așa cum s-a discutat mai sus, aceste resturi ar putea fi implicate direct ca resturi de contact în situl de legare anticorp sau ar putea contribui critic la menținerea arhitecturii scheletului moleculei anticorpului din această regiune. Ambele poziții sunt importante pentru legare la hTNF α deoarece atunci când se folosește 3C-H2 VH CDR3 (care are o valină pentru schimbare alanină la poziția 1 considerând D2E7 VH CDR3) scFv are o rată de detașare de 3 ori mai rapidă decât atunci când se folosește D2E7 VH CDR3, dar această rată de detașare este încă de 4 ori mai lentă decât atunci când se folosește 2SD4 VH CDR3 (care are schimbări la ambele poziții 1 și 7 față de D2E7 VH CDR3).

EXEMPLUL 4: Activitate funcțională a D2E7

Pentru a examina activitatea funcțională a D2E7, anticorpul s-a folosit în câteva analize care măsoară capacitatea anticorpului de a inhiba activitatea hTNF α , fie *in vitro*, fie *in vivo*.

A. Neutralizarea citotoxicității indusă TNF α în celule L929

TNF α uman recombinant (rhTNF α) produce citotoxicitate celulară pentru celule murine L929 după o perioadă de incubare de 18-24 ore. Anticorpi umani anti-hTNF α au fost evaluați în analize L929 prin coincubarea anticorpilor cu rhTNF α și celule după cum urmează. O placă de microtitrare cu 96 godeuri conținând 100 μ l Ab anti-hTNF α a fost diluată serial 1/3 în duplicate folosind mediul RPMI care conține 10% ser fetal bovin (FBS). S-au adăugat 50 μ l rhTNF α pentru o concentrație finală de 500 pg/ml în fiecare godeu cu probă. Apoi, plăcile s-au incubat 30 minute la temperatura camerei. În continuare, s-au adăugat celule fibroblastice de șoarece L929 sensibile la TNF α pentru o concentrație finală de 5×10^4 celule per godeu, incluzând 1 μ g/ml Actinomycină-D. Controalele au inclus mediu plus celule și rhTNF α .



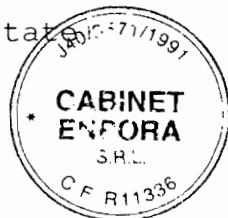
plus celule. Aceste controale și o curbă standard TNF α , în domeniul de la 2 ng/ml până la 8,2 pg/ml, s-au folosit pentru determinarea calității analizei și pentru a asigura o fereastră a neutralizării. Apoi, plăcile s-au incubat peste noapte (18-24 ore) la 37°C în 5% CO₂. S-au îndepărtat 100 μ l mediu din fiecare godeu și s-au adăugat 50 μ l de 5 mg/ml bromură de 3, (4,4-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazoliu (MTT; accesibilă comercial de la Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) în PBS. Apoi, plăcile s-au incubat 4 ore la 37°C. S-au adăugat apoi 50 μ l dodecil sulfat de sodiu 20% (SDS) la fiecare godeu și plăcile s-au incubat peste noapte la 37°C. S-a măsurat densitatea optică la 570/630 nm, curbele s-au marcat pentru fiecare probă și s-au determinat valorile IC₅₀ prin metode standard.

Rezultatele reprezentative pentru anticorpi umani având diverse perechi VL și VH, așa cum s-au comparat la mAb murin MAK 195, sunt prezentate în Figura 3 și în Tabelul 7 de mai jos.

Tabelul 7: Neutralizarea citotoxicității L929 indusă TNF α

VH	VL	Structură	IC ₅₀ , M
D2E7	D2E7	scFv	1,1x10 ⁻¹⁰
D2E7	D2E7	IgG4	4,7x10 ⁻¹¹
2SD4	2SD4	scFv/IgG1/IgG4	3,0x10 ⁻⁷
2SD4	LOE7	scFv	4,3x10 ⁻⁸
VH1-D2	2SD4	scFv	1,0x10 ⁻⁸
VH1-D2	LOE7	scFv/IgG1/IgG4	3,4x10 ⁻¹⁰
VH1-D2	LOE7.T	IgG4	8,1x10 ⁻¹¹
VH1-D2	LOE7.T	IgG4	1,3x10 ⁻¹⁰
VH1-D2	LOE7.A	IgG4	2,8x10 ⁻¹¹
VH1-D2	LOE7.A	IgG4	6,2x10 ⁻¹¹
MAK 195	MAK 195	scFv	1,9x10 ⁻⁸
MAK 195	MAK 195	F(ab') ₂	6,2x10 ⁻¹¹

Rezultatele din Figura 3 și Tabelul 7 demonstrează că anticorpul uman anti-hTNF α D2E7 și diverși anticorpi înrudiți D2E7, neutralizează citotoxicitatea L929 indusă TNF α cu o capacitate



aproximativ echivalentă celei a mAb murin anti-hTNF α MAK 195.

În altă serie de experimente s-a examinat cum s-a descris mai sus, capacitatea formei IgG1 a D2E7 de a neutraliza citotoxicitatea L929 indusă TNF α . Rezultatele de la 3 experimente independente și media acestora sunt rezumate în Tabelul 8 de mai jos:

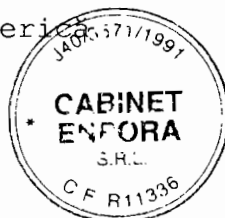
Tabelul 8: Neutralizarea citotoxicității L929 indusă TNF α prin IgG1 D2E7

<u>Experiment</u>	<u>IC₅₀[M]</u>
1	1,26x10 ⁻¹⁰
2	1,33x10 ⁻¹⁰
3	1,15x10 ⁻¹⁰
Medie	1,25±0,01x10 ⁻¹⁰

Această serie de experimente a confirmat că D2E7, în forma IgG1 de lungime întreagă, neutralizează citotoxicitatea L929 indusă TNF α cu IC₅₀[M] mediu de 1,25±0,01x10⁻¹⁰.

B. Inhibarea legării TNF α la receptori TNF α pe celule U-937

Capacitatea anticorpilor umani anti-hTNF α de a inhiba legarea hTNF α la receptori hTNF α pe suprafața celulelor a fost examinată folosind linia de celule U-937 (ATCC nr. CRL 1593), o linie celulară histiocitică umană care exprimă receptori hTNF α . Celulele U-937 s-au crescut în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin (Hyclone A-1111, Hyclone Laboratories, Logan, UT), L-glutamină (4 nM), soluție tampon HEPES (10 mM), penicilină (100 μ g/ml) și streptomycină (100 μ g/ml). Pentru a examina activitatea anticorpilor IgG, celule U-937 s-au preincubat cu PBS suplimentat cu 1 mg/ml IgG uman (Sigma I-4506, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) timp de 45 minute pe gheață și apoi celulele s-au spălat de 3 ori cu tampon de legare. Pentru testul legării receptorului, celulele U-937 (5x10⁶ celule/godeu) s-au incubat într-un tampon de legare (PBS suplimentat cu 0,2% albumină serică



bovină) în plăci de microtitrare cu 96 godeuri (Costar 3799, Costar Corp., Cambridge, MA) împreună cu rhTNF α marcat ^{125}I (3×10^{-10} M; 25 $\mu\text{Ci/ml}$; obținut de la BEB Research Products, Wilmington, DE), cu sau fără anticorpi anti-hTNF α , într-un volum total de 0,2 ml. Plăcile s-au incubat pe gheață timp de 1,5 ore. Apoi, 75 μl al fiecărei probe s-au transferat la eprubete de testat 1,0 ml (Sastedt 72,700, Sarstedt Corp., Princeton NJ) conținând dibutilftalat (Sigma D-2270, Sigma Chemical Co., St.Louis,MO) și dinonilftalat (ICN 210733, ICN, Irvine, CA). Eprubetele de testat au conținut un amestec 300 μl de dibutilftalat și dinonilftalat, raport volum respectiv 2:1. S-a îndepărtat rhTNF α marcat ^{125}I , liber (adică, nelegat) prin microcentrifugare timp de 5 minute. Apoi, fiecare eprubetă de testat a conținut în final un pelet celular care s-a decupat cu ajutorul unei foarfeci pentru microeprubete (Bel-Art 210180001, Bel-Art Products, Pequannock, NJ). Peletul celular conține rhTNF α marcat ^{125}I legat la receptorul TNF α p60 sau p80, în timp ce în faza apoasă de mai sus amestecul de ulei conține un exces de rhTNF α liber marcat ^{125}I . Toate peletele celulare s-au colectat într-o eprubetă de numărare (Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) și s-au numărat într-un contor de scintilație.

Rezultatele reprezentative sunt prezentate în Figura 4. Valoarea IC_{50} pentru inhibarea legării hTNF α de către D2E7 la receptori hTNF α pe celule U-937 este de aproximativ 3×10^{-10} M în aceste experimente. Aceste rezultate, demonstrează că anticorpul uman anti-hTNF α D2E7 inhibă legarea rhTNF α la receptori hTNF α pe celule U-937 la concentrații aproximativ echivalente celor ale mAb murin anti-hTNF α MAK 195.

În altă serie de experimente a fost examinată cum s-a descris mai sus capacitatea formei IgG1 a D2E7 de a inhiba legarea rhTNF α la receptori hTNF α pe celule U-937. Rezultatele de la 3 experimente independente și media lor sunt rezumate în Tabelul 9.



Tabelul 9: Inhibarea legării receptorului TNF pe celule U-937 prin IgG1 D2E7

<u>Experiment</u>	<u>IC₅₀ [M]</u>
1	1,70x10 ⁻¹⁰
2	1,49x10 ⁻¹⁰
3	1,50x10 ⁻¹⁰
Medie	1,56±0,12x10 ⁻¹⁰

Această serie de experimente a confirmat că D2E7, în forma IgG1 de lungime întreagă, inhibă legarea receptorului TNF pe celule U-937 cu IC₅₀[M] mediu de 1,56±0,12x10⁻¹⁰.

Pentru a investiga potența inhibitoare a D2E7 în legarea rhTNF ¹²⁵I la receptori individuali p55 și p75, s-a realizat un radioimunotest în fază solidă. Pentru a măsura valorile IC₅₀ ale D2E7 pentru receptori separați TNF, s-au incubat diverse concentrații ale anticorpului cu 3x10⁻¹⁰ concentrație de rhTNF ¹²⁵I. Apoi, amestecul s-a testat pe plăci separate conținând receptor fie p55, fie p75 TNF într-un mod dependent de doză. Rezultatele sunt rezumate mai jos în Tabelul 10:

Tabelul 10: Inhibarea legării receptorului TNF la p55 și p75 TNFR prin D2E7 IgG1

<u>Reactiv</u>	<u>IC₅₀ [M]</u>	
	p55 TNFR	p75 TNFR
D2E7	1,47x10 ⁻⁹	1,26x10 ⁻⁹
rhTNF	2,31x10 ⁻⁹	2,70x10 ⁻⁹

Inhibarea legării rhTNF ¹²⁵I la receptori p55 și p75 TNF pe celule U,937 prin D2E7 a urmat o curbă sigmoidală simplă, indicând valori IC₅₀ pentru fiecare receptor. În experimentele radioimunotest în fază solidă (RIA) cu receptori recombinanți TNF, s-au calculat valori IC₅₀ pentru inhibarea legării rhTNF ¹²⁵I la receptorii p55 și p75 prin D2E7 ca 1,47x10⁻⁹ și respectiv, 1,26x10⁻⁹ M. Descreșterea în valorile IC₅₀ în faza solidă s-a datorat probabil densității mai mari a receptorilor în formă



RIA, deoarece rhTNF nemarcat a inhibat de asemenea, cu valori IC_{50} similare. Valorile IC_{50} pentru inhibarea legării rhTNF ^{125}I la receptorii p55 și p75 prin rhTNF nemarcat au fost $2,31 \times 10^{-9}$ și respectiv, $2,70 \times 10^{-9}$ M.

C. Inhibarea expresiei ELAM-1 pe HUVEC

Celule endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVEC) pot fi induse să exprime molecula 1 de adeziune a leucocitului la celula endotelială (ELAM-1) pe suprafața celulei lor prin tratament cu hTNF α , care poate fi detectat prin reacția HUVEC tratate hTNF α cu un anticorp de șoarece anti-uman ELAM-1. Capacitatea anticorpilor umani anti-hTNF α de a inhiba această expresie indusă TNF α a ELAM-1 pe HUVEC s-a examinat după cum urmează: HUVEC (ATCC Nr. CRL 1730) s-au plasat în plăci cu 96 godeuri (5×10^4 celule/godeu) și s-au incubat peste noapte la 37°C. În ziua următoare, s-au preparat diluții seriale de anticorp uman anti-hTNF α (1:10) într-o placă de microtitrare, începând cu 20-100 μ g/ml anticorp. O soluție stoc de rhTNF α s-a preparat la 4,5 ng/ml, s-au adăugat alicote rhTNF α la fiecare godeu conținând anticorp și conținuturile s-au amestecat bine. Controalele au inclus numai mediu, mediu plus anticorp anti-hTNF α și mediu plus rhTNF α . Plăcile HUVEC s-au îndepărtat de la incubarea lor la 37°C peste noapte și mediul din fiecare godeu s-a aspirat cu grijă. S-au transferat 200 μ l amestec anticorp-rhTNF α la fiecare godeu al plăcilor HUVEC. Apoi, plăcile HUVEC s-au incubat în continuare la 37°C timp de 4 ore. În continuare, stocul de anticorp murin anti-ELAM-1 s-a diluat 1:10000 în RPMI. Mediul din fiecare godeu al plăcii HUVEC s-a aspirat cu grijă, s-au adăugat 50 μ l/godeu soluție anticorp anti-ELAM-1 și plăcile HUVEC s-au incubat 60 minute la temperatura camerei. S-a preparat o soluție anticorp Ig anti-șoarece marcată ^{125}I în RPMI (aproximativ 50000 cpm în 50 μ l). Mediul din fiecare godeu al plăcilor HUVEC a fost aspirat cu atenție, godeurile s-au spălat de 2 ori cu RPMI și la fiecare godeu s-au adăugat 50 μ l soluție Ig anti-șoarece marcată



Plăcile s-au incubat 1 oră la temperatura camerei și apoi fiecare godeu s-a spălat de 3 ori cu RPMI. S-au adăugat 180 μl SDS 5% la fiecare godeu pentru liza celulelor. Apoi, lizatul celular de la fiecare godeu s-a transferat într-o eprubetă și s-a numărat într-un contor de scintilație.

Rezultatele reprezentative sunt prezentate în Figura 5. Valoarea IC_{50} pentru inhibarea expresiei ELAM-1 pe HUVEC indusă hTNF α D2E7 este de aproximativ 6×10^{-11} M în aceste experimente. Aceste rezultate demonstrează că anticorpul uman D2E7 anti-hTNF α inhibă expresia indusă hTNF α a ELAM-1 pe HUVEC la concentrații aproximativ echivalente celor ale mAb murin anti-hTNF α MAK 195.

În altă serie de experimente, capacitatea formei IgG1 a D2E7 de a inhiba expresia indusă hTNF α a ELAM-1 pe HUVEC s-a examinat cum s-a descris mai sus. Rezultatele de la 3 experimente independente și media lor sunt rezumate mai jos în Tabelul 11.

Tabelul 11: Inhibarea expresiei ELAM-1 indusă TNF α prin receptor IgG1 D2E7

Experiment	IC_{50} [M]
1	$1,95 \times 10^{-10}$
2	$1,69 \times 10^{-10}$
3	$1,90 \times 10^{-10}$
Medie	$1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$

Această serie de experimente a confirmat că D2E7, în forma IgG1 de lungime întreagă, inhibă expresia ELAM-1 pe HUVEC indusă TNF α cu IC_{50} [M] mediu de $1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$.

De asemenea, s-a examinat potența de neutralizare a D2E7 IgG1 pentru expresia indusă rhTNF a altor 2 molecule de adeziune ICAM-1 și VCAM-1. Deoarece curba de titrare rhTNF pentru expresia ICAM-1 la 16 ore a fost similară curbei de expresie a ELAM-1. Aceeși concentrație de rhTNF s-a folosit în experimentele de neutralizare anticorp. S-au incubat HUVEC cu rhTNF în prezența a diverse concentrații D2E7 într-un incubator CO₂ la 37°C timp de 16 ore, și s-a măsurat expresia ICAM-1 prin anticorp de șoarec.



anti-ICAM-1 urmată de anticorp de oaie anti-șoarece marcat ¹²⁵I. S-au realizat 2 experimente independente și s-au calculat valorile IC₅₀. Un anticorp uman neînrudit IgG1 nu inhibă expresia ICAM-1.

Procedura experimentală pentru testarea inhibării expresiei VCAM-1 a fost aceeași ca procedura pentru expresia ELAM-1 cu excepția că s-a folosit MAb anti-VCAM-1 în loc de MAb anti-ELAM-1. S-au realizat 3 experimente independente și s-au calculat valorile IC₅₀. Un anticorp neînrudit IgG1 uman nu inhibă expresia VCAM-1.

Rezultatele sunt rezumate în Tabel 12.

Tabelul 12: Inhibarea expresiei ICAM-1 și VCAM-1 prin D2E7 IgG1

Inhibare ICAM-1		IC ₅₀ [M]	
Experiment	IC ₅₀ [M]	Experiment	IC ₅₀ [M]
1	1,84x10 ⁻¹⁰	1	1,03x10 ⁻¹⁰
2	2,49x10 ⁻¹⁰	2	9,26x10 ⁻¹¹
		3	1,06x10 ⁻¹⁰
Medie	2,17±0,46x10 ⁻¹⁰	Medie	1,01±0,01x10 ⁻¹⁰

Aceste experimente demonstrează că tratamentul celulelor endoteliale ale venei ombilicale umane primare cu rhTNF au condus la expresia optimă a moleculelor de adeziune ELAM-1 și VCAM-1 la 4 ore, și la expresie maximă reglată crescător a ICAM-1 la 16 ore. D2E7 a fost capabil să inhibe expresia a 3 molecule de adeziune în mod dependent de doză. Valorile IC₅₀ pentru inhibarea ELAM-1, ICAM-1 și VCAM-1 au fost 1,85x10⁻¹⁰, 2,17x10⁻¹⁰ și respectiv, 1,01x10⁻¹⁰. Aceste valori au fost similare, indicând cerințe similare pentru doza de activare a semnalului rhTNF de a induce expresia ELAM-1, ICAM-1 și VCAM-1. Interesant, D2E7 a fost eficient similar în testul de inhibare mai lungă a inhibării ICAM-1. Testul de inhibare ICAM-1 a necesitat 16 ore de coincubare a rhTNF și D2E7 cu HUVEC opus la cele 4 ore necesare pentru testele de inhibare ELAM-1 și VCAM-1. Deoarece D2E7 are o rată de detașare lentă pentru rhTNF, este de imaginat că în



timpul perioadei de 16 ore de coincubare nu a existat nici o competiție semnificativă prin receptorii TNF asupra HUVEC.

D. Neutralizarea hTNFα in vivo

S-au folosit 3 sisteme diferite *in vivo* pentru a demonstra că D2E7 este eficient pentru inhibarea activității hTNFα *in vivo*.

I. Inhibarea letalității indusă TNF la șoareci sensibilizați D-galactozamină

Injecția TNFα uman recombinant (rhTNFα) la șoareci sensibilizați D-galactozamină produce letalitate într-o perioadă de timp de 24 ore. Agenți care neutralizează TNFα s-au dovedit a împiedica letalitatea în acest model. Pentru a examina capacitatea anticorpilor umani anti-hTNFα de a neutraliza hTNFα *in vivo* în acest model, s-au injectat șoareci C57B1/6 cu diverse concentrații de D2E7-IgG1 sau o proteină de control, în PBS intraperitoneal (i.p.). Șoarecii s-au provocat 30 minute mai târziu cu 1 μg rhTNFα și 20 mg D-galactozamină în PBS i.p. și s-au observat 24 ore mai târziu. Aceste cantități rhTNFα și D-galactozamină au fost determinate anterior pentru a obține o letalitate de 80-90% în acești șoareci.

Rezultate reprezentative ilustrate ca un grafic cu bare, al supraviețuirii % față de concentrația anticorp, sunt prezentate în Figura 6. Barele negre reprezintă D2E7, în timp de barele hașurate reprezintă MAK 195. Injecția a 2,5-25 μg anticorp D2E7 per șoarece a protejat animalele de letalitatea indusă TNFα. Valoarea ED₅₀ este de aproximativ 1-2,5 μg/șoarece. Anticorpul de control pozitiv, MAK 195, a fost similar în capacitatea sa protectoare. Injecția D2E7 în absența rhTNFα nu a avut nici un efect dăunător asupra șoarecilor. Injecția unui anticorp IgG1 uman nespecific nu oferă nici o protecție de letalitatea indusă TNFα.

Într-un al doilea experiment, 49 șoareci s-au împărțit în



7 grupuri egale. Fiecare grup a primit doze D2E7 care variaza 30 minute înainte de a primi o doza LD₈₀ amestec rhTNF/D-galactozamină (1,0 µg rhTNF și 20 mg D-galactozamină per șoarece). Grupul de control 7 a primit anticorp kappa IgG1 uman normal la doza 25 µg/șoarece. Șoarecii s-au examinat 24 ore mai târziu. Supraviețuirea pentru fiecare grup este rezumată mai jos în Tabelul 13.

Tabelul 13: Supraviețuire 24 ore după tratament cu D2E7

<u>Grup</u>	<u>Supraviețuire (vii/total)</u>	<u>Supraviețuire (%)</u>
1 (fără anticorp)	0/7	0
2 (1 µg)	1/7	14
3 (2,6 µg)	5/7	71
4 (5,2 µg)	6/7	86
5 (26 µg)	6/7	86
6 (26 µg; fără rhTNF)	7/7	100
7 (15 µg Hu IgG1)	1/7	14

II. Inhibarea febrei indusă TNF la iepure

S-a examinat eficacitatea D2E7 în inhibarea răspunsului de febră indusă rhTNF la iepuri. Grupuri de iepuri femele NZW cântărind aproximativ 2,5 kg fiecare s-au injectat intravenos cu D2E7, rhTNF și complexe imune D2E7 și rhTNF. S-au măsurat temperaturile rectal prin sonde termistor pe un înregistrator termic Kaye la fiecare minut aproximativ 4 ore. TNF recombinant uman în soluție salină injectat la 5 µg/kg, a provocat o creștere a temperaturii mai mare de 0,4°C la aproximativ 45 minute după injectare. Preparatul anticorp el însuși, în soluție salină la o doză de 138 µg/kg nu provoacă o creștere în temperatură la iepuri până la 140 minute după administrare. În toate experimentele care au urmat, D2E7 sau reactivi de control (IgG1 uman sau un vehicul salin) s-au injectat i.v. la iepuri după 15



minute mai târziu printr-o injecție de rhTNF în soluție salină la 5 μg/kg i.v. Rezultatele reprezentative de la câteva experimente sunt rezumate mai jos în Tabelul 14:

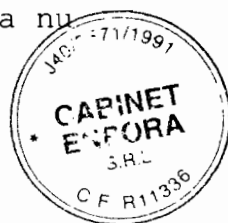
Tabelul 14: Inhibarea febrei indusă rhTNF la iepuri cu D2E7

Doză D2E7 (μg/kg)	Creștere temp.*, °C		Inhib. %**	Raport molar	Maxim temp.
	rhTNF	rhTNF + D2E7		D2E7:rhTNF	minute post rhTNF
14	0,53	0,25	53	1	60
24	0,43	0,13	70	1,6	40
48	0,53	0,03	94	3,3	50
137	0,53	0,00	100	9,5	60
792	0,80	0,00	100	55	60

* = maxim temperatură

**= inhibare % = $(1 - \{\text{creștere temperatură cu rhTNF \& D2E7} / \text{creștere temperatură cu rhTNF singur}\}) \times 100$.

Pretratamentul intravenos cu D2E7 la o doză de 14 μg/kg a inhibat parțial răspunsul pirogenic, comparat la iepuri pretratați numai cu soluție salină. D2E7 administrat la 137 μg/kg a suprimat total răspunsul pirogenic al rhTNF în același experiment. În al doilea experiment, D2E7 administrat la 24 μg/kg de asemenea a suprimat parțial răspunsul pirogenic, comparat la iepuri tratați numai cu soluție salină. Raportul molar al D2E7 față de rhTNF a fost 1/6:1 în acest experiment. În al treilea experiment, D2E7 injectat i.v. la 48 μg/kg (raport molar D2E7:rhTNF=3,3:1) a suprimat total răspunsul pirogenic, comparat la iepuri pretratați cu IgG1 uman de control în soluție salină la 30 μg/kg. În experimentul final, iepuri pretratați cu D2E7 (792 μg/kg) la un raport molar foarte ridicat față de rhTNF (55:1) nu dezvoltă nici o creștere în temperatură la orice moment până la 4 ore de observație. Tratamentul iepurilor cu complexe imune generate de la un amestec D2E7 și rhTNF incubat la 37°C timp de 1 oră, la un raport molar de 55:1, fără administrare subsecventă de rhTNF, de asemenea nu



provoacă nici o creștere de temperatură în același experiment.

III. Prevenirea poliartritei la șoareci transgenici Tg197

Efectul D2E7 asupra dezvoltării bolii s-a investigat într-un model murin de artrită. S-au generat șoareci transgenici (Tg197) care exprimă TNF uman de tip sălbatic (modificat în regiunea 3' dincolo de secvențele de codificare) și acești șoareci dezvoltă poliartrită cronică cu incidență 100% la vârsta de 4-7 săptămâni (vezi, *EMBO J* (1991)10:4025-4031 pentru descrierea suplimentară a modelului de poliartrită Tg197).

Animale transgenice s-au identificat prin PCR la vârsta de 3 zile. Grupuri de șoareci transgenici născuți o dată s-au împărțit în 6 grupuri. Șoarecii transgenici s-au verificat prin analiza de hibridizare slot-blot la vârsta de 15 zile. Protocoalele tratamentului pentru cele 6 grupuri au fost cum urmează: Grup 1=fără tratament; Grup 2=soluție salină (vehicul); Grup 3=D2E7 la 1,5 $\mu\text{g/g}$; Grup 4=D2E7 la 15 $\mu\text{g/g}$; Grup 5=D2E7 la 30 $\mu\text{g/g}$; și Grup 6=izotip de control IgG1 la 30 $\mu\text{g/g}$. De asemenea, a fost inclus în studiu un grup de șoareci născuți o dată netransgenici pentru a servi drept control (Grup 7 - netransgenici; fără tratament). Fiecare grup a primit 3 injecții i.p. per săptămână din tratamentele indicate. Injecțiile au continuat timp de 10 săptămâni. În fiecare săptămână s-au înregistrat schimbările macroscopice în morfologia articulației pentru fiecare animal. La 10 săptămâni, toți șoarecii au fost sacrificați și țesutul de șoarece s-a colectat în formalină. S-au realizat examinări microscopice ale țesutului.

La începutul fiecărei săptămâni au fost luate greutatea în grame pentru fiecare șoarece. De asemenea, la același moment s-au făcut măsurători ale mărimii articulației (în mm) ca o măsură a severității bolii. Mărimea articulației a fost stabilită ca o medie a 3 măsurători ale gleznei piciorului drept posterior folosind un micrometru. Scorurile artritice s-au înregistrat săptămânal după cum urmează: 0=fără artrită (aparitie și flexiune



normală); +=artrită ușoară (articulație deformată); ++=artrită moderată (umflare, deformarea articulației) și +++= artrită grea (anchiloză detectată asupra flexiunii și mișcare deteriorată sever). Scorurile histopatologice bazate pe colorație hematoxină/eozină a secțiunilor articulației au fost bazate după cum urmează: 0=fără boală detectabilă; 1=proliferarea membranei sinoviale; 2=îngroșare puternică a membranei sinoviale; 3=distrugerea cartilajului și eroziunea osului.

Efectul tratamentului asupra mărimii medii a articulației a șoarecilor artritici transgenici Tg197 este prezentat în graficul Figurii 9. Scorurile histopatologice și artritice ale șoarecilor transgenici Tg197, la vârsta de 11 săptămâni sunt rezumate mai jos în Tabelul 15:

Tabelul 15: Efectul D2E7 asupra histopatologiei și scorului artritic la șoareci Tg197

Grup	Tratament	Scor histopatologic	Scor artritic
1	fără	3(7/7)	+++ (7/7)
2	soluție salină	3(8/8)	+++ (8/8)
6	control IgG1	3(9/9)	+++ (7/9)
3	D2E7 la 1,5 μ g/g	0(6/8)	0(8/8)
4	D2E7 la 15 μ g/g	0(7/8)	0(8/8)
5	D2E7 la 30 μ g/g	0(8/8)	0(8/8)

Acest experiment a demonstrat că anticorpul D2E7 are un efect benefic definit asupra șoarecilor transgenici care exprimă TNF uman de tip sălbatic (Tg197) fără nici o artrită evidentă după perioada studiului.

E. Neutralizarea D2E7 a TNF α de la alte specii

Specificitatea legării D2E7 s-a examinat prin măsurarea capacității sale de a neutraliza factorii necrozei tumorii de la diverse specii primate și de la șoarece, folosind un test de



citotoxicitate L929 (cum s-a descris în Exemplul 4, subsecțiunea A, de mai sus). Rezultatele sunt rezumate în Tabelul 7 de mai jos.

Tabelul 16: Capacitatea D2E7 de a neutraliza hTNFα de la diferite specii în analiza L929

<u>TNFα</u>	<u>Sursă</u>	<u>IC₅₀ pentru neutralizare D2E7 (M)**</u>
Uman	Recombinant	7,8x10 ⁻¹¹
Cimpanzeu	LPS-stimulat PBMC	5,5x10 ⁻¹¹
Babuin	Recombinant	6,0x10 ⁻¹¹
Sanguin	LPS-stimulat PBMC	4,0x10 ⁻¹⁰
Cynomolgus	LPS-stimulat PBMC	8,0x10 ⁻¹¹
Rhesus	LPS-stimulat PBMC	3,0x10 ⁻¹¹
Canin	LPS-stimulat PBMC	2,2x10 ⁻¹⁰
Porcin	Recombinant	1,0x10 ⁻⁷
Murin	Recombinant	>1,0x10 ⁻⁷

Rezultatele din Tabelul 16 demonstrează că D2E7 poate neutraliza activitatea a 5 TNFα de la primat aproximativ echivalent TNFα uman și mai mult, pot neutraliza activitatea TNFα canin (aproximativ de 10 mai puțin bine decât TNFα uman) și TNFα porcin și de șoarece (aproximativ de 1000 de ori mai puțin bine decât TNFα uman). Mai mult, legarea D2E7 la rhTNFα în fază de soluție nu a fost inhibată de alte citokine ca limfotoxină (TNFβ), IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFNγ și TGFβ, arătând că D2E7 este foarte specific pentru ligandul său TNFα.

F. Absența eliberării citokinei de sânge uman integral incubat cu D2E7

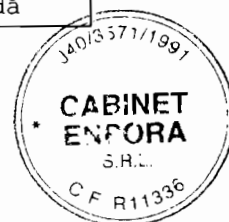
În acest exemplu, s-a examinat capacitatea D2E7 de a induce, prin el însăși, celule sanguine umane normale să secrete citokine



sau molecule așezate pe suprafața celulei. D2E7 s-a incubat cu sânge integral diluat de la 3 donatori normali diferiți la diferite concentrații timp de 24 ore. La același moment, s-a desfășurat un control pozitiv LPS, la o concentrație determinată anterior de a stimula celule sanguine imunocompetente să secrete citokine. Supernatantele au fost recoltate și testate într-un tablou de truse ELISA cu 10 citokine solubile, receptor și molecule de adeziune: IL-1 α , IL-1 β , receptor antagonist IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , receptor I TNF solubil, receptor II TNF solubil, ICAM-1 solubil, și E-selectină solubilă. Nu s-au măsurat cantități semnificative de citokină sau molecule prezente pe suprafața celulei ca urmare a coincubării anticorpului D2E7, la concentrații de până la 343 mg/ml. Culturi de control fără adăugare de anticorp de asemenea nu au dat cantități măsurabile de citokine, în timp ce cocultura de control LPS a dat valori ridicate la un domeniu în picograme crescut la nanograme scăzut. Aceste rezultate arată că D2E7 nu induce celule de sânge integral să secrete citokine sau proteine prezente pe suprafața celulei peste nivelurile normale în culturi *ex vivo*.

Ca formând o parte a prezentei descrieri este anexată Lista Secvențelor, al cărei conținut este rezumat în tabelul de mai jos.

SEQ ID NR:	CATENĂ ANTICORP	REGIUNE	TIP SECVENȚĂ
1	D2E7	VL	aminoacidă
2	D2E7	VH	aminoacidă
3	D2E7	VL CDR3	aminoacidă
4	D2E7	VH CDR3	aminoacidă
5	D2E7	VL CDR2	aminoacidă
6	D2E7	VH CDR2	aminoacidă
7	D2E7	VL CDR1	aminoacidă
8	D2E7	VH CDR1	aminoacidă
9	2SD4	VL	aminoacidă
10	2SD4	VH	aminoacidă
11	2SD4	VL CDR3	aminoacidă



12	EP B12	VL CDR3	aminoacidă
13	VL10E4	VL CDR3	aminoacidă
14	VL100A9	VL CDR3	aminoacidă
15	VLL100D2	VL CDR3	aminoacidă
16	VLL0F4	VL CDR3	aminoacidă
17	LOE5	VL CDR3	aminoacidă
18	VLLOG7	VL CDR3	aminoacidă
19	VLLOG9	VL CDR3	aminoacidă
20	VLLOH1	VL CDR3	aminoacidă
21	VLLOH10	VL CDR3	aminoacidă
22	VL1B7	VL CDR3	aminoacidă
23	VL1C1	VL CDR3	aminoacidă
24	VL0.1F4	VL CDR3	aminoacidă
25	VL0.H8	VL CDR3	aminoacidă
26	LOE7.A	VL CDR3	aminoacidă
27	2SD4	VH CDR3	aminoacidă
28	VH1B11	VH CDR3	aminoacidă
29	VH1D8	VH CDR3	aminoacidă
30	VH1A11	VH CDR3	aminoacidă
31	VH1B12	VH CDR3	aminoacidă
32	VH1E4	VH CDR3	aminoacidă
33	VH1F6	VH CDR3	aminoacidă
34	3C-H2	VH CDR3	aminoacidă
35	VH1-D2.N	VH CDR3	aminoacidă
36	D2E7	VL	acid nucleic
37	D2E7	VH	acid nucleic

Specialiștii în domeniu vor recunoaște sau vor fi capabili să stabilească folosind nu mai mult decât experimentarea de rutină, numeroase echivalente la realizările specifice ale invenției descrise aici.



Revendicări

1. Utilizare a unui anticorp uman izolat, sau a unei porțiuni de legare la antigen a acestuia, care disociază din TNF α uman cu o K_d de 1×10^{-8} M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC $_{50}$ de 1×10^{-7} M sau mai mică, la fabricarea unui medicament pentru tratamentul unei tulburări în care activitatea TNF α este nocivă, în care anticorpul se administrează în combinație cu cel puțin un agent suplimentar unui subiect astfel încât se inhibă activitatea TNF α uman.

2. Utilizare conform revendicării 1, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, are următoarele caracteristici:

a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

3. Utilizare conform revendicării 1, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care leagă antigenul, are o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.



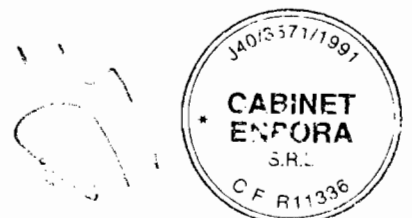
4. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1, 2 sau 3, în care tulburarea este selectată din grupul constând dintr-o boală autoimună, o tulburare intestinală, o boală infecțioasă, respingerea transplantului sau boala grefă-contra-gazdă, afecțiune malignă, o tulburare pulmonară și o tulburare cardiacă.

5. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1, 2 sau 3, în care tulburarea este sepsis.

6. Utilizare conform revendicării 5, în care anticorpii umani izolați, sau porțiunile acestora care se leagă la antigen, se administrează unui subiect uman împreună cu citokina interleukină-6 (IL-6), sau se administrează unui subiect uman cu o concentrație în ser sau plasmă a IL-6 peste 500 pg/ml.

7. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1, 2 sau 3, în care tulburarea este selectată din grupul constând din tulburări inflamatorii osoase, boala resorbției osoase, hepatita alcoolică, hepatita virală, hepatita fulminantă, tulburări de coagulare, arsuri, leziuni legate de reperfuzie, formarea cheloidului, formarea țesutului cicatricial, pirexie, boala periodontală, obezitate, toxicitatea radiațiilor, șoc septic, șoc endotoxic, sepsis gram negativ, sindromul șocului toxic, malarie, meningită, cașexie, SIDA, meningită bacteriană, complexul înrudit cu SIDA (ARC), malarie cerebrală, infecție cu citomegalovirus consecutivă transplantului, febră și mialgii din cauza infecției și cașexiei consecutivă infecției, respingerea alogrefei, respingerea xenogrefei, stimularea creșterii tumorii, creșterea potențialului metastazic și medierea citotoxicității în afecțiunile maligne și inhibarea creșterii tumorii sau a metastazei.

8. Utilizare conform revendicării 4, în care tulburarea autoimună este selectată din grupul constând din artrită reumatoidă, spondilită reumatoidă, osteoartrită, artrită gutoasă, alergii, scleroză multiplă, diabet autoimun, uveită autoimună și sindrom nefritic.



9. Utilizare conform revendicării 4, în care tulburarea pulmonară este selectată din grupul constând din sindromul detresei respiratorii la adult, plămân de șoc, boală inflamatorie cronică pulmonară, sarcoidoză pulmonară, fibroză pulmonară, și silicoză.

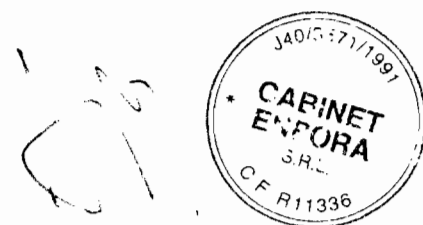
10. Utilizare conform revendicării 4, în care tulburarea intestinală este selectată din grupul constând din afecțiune intestinală inflamatorie, boală intestinală inflamatorie idiopatică, boala Crohn, și colita ulcerativă.

11. Utilizare conform revendicării 4, în care tulburarea cardiacă este selectată din grupul constând din ischemie cardiacă, insuficiență cardiacă și hepatită.

12. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 11, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, se combină cu un purtător acceptabil farmaceutic.

13. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 12, în care subiectul este uman.

14. Utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 13, în care agentul terapeutic suplimentar este selectat din grupul constând din ibuprofen, iradiere limfoidă totală, inhibitor de interleukină-1, OKT3, anticorp anti-CD25, anticorp anti-CD11a, anticorp anti-CD54, anticorp anti-CD54, anticorp anti-CD28, anticorp anti-CD80, anticorp anti-CD86, medicamente antiinflamatoare nestereoidiene, medicamente antiinflamatoare nestereoidiene, CDP-571/BAY-10-3356, cA2, 75 kdTNFR-IgG 55 kdTNFR-IgG, IDEC-CE9.1/SB 210396, DAB486-IL-2, DAB389-IL-2, Anti-Tac, IL-4, IL-10, agoniști IL-4, agoniști IL-10, IL-IRA, TNF-bp/s-TNFR, S284, R973401, MK-966, iloprost, metotrexat, talidomidă, medicamente înrudite cu talidomida, leflunomidă, acid tranexanic, T-614, prostaglandină E1,



tenidap, naproxen, meloxicam, piroxicam, diclofenac, indometacin, sulfasalazină, azatioprin, inhibitori ICE, inhibitori zap-70, inhibitori Ick, inhibitori VEGF, inhibitori VEGF-R, corticosteroizi, inhibitori TNF-convertoază, anticorpi anti-IL-12, interleukină-11, interleukină-13, inhibitori ai interleukinei-17, aur, penicilamină, clorochină, hidroxiclorochină, clorambucil, ciclofosfamidă, ciclosporină, globulină anti-timocit, anticorpi anti-CD4, toxine CD5, peptide administrate oral, collagen, lobenzarit disodic, agenți de reglare ai citokinei HP228 și HP466, oligodeoxinucleotide fosforotioat antisens ICAM-1, receptor 1 complement solubil, prednison, orgotein, polisulfat de glicosaminoglican, minociclină, anticorpi anti-IL2R, lipide marine, lipide botanice, auranofin, fenilbutazonă, acid meclofenamic, acid flufenamic, globulină imună intravenoasă, zileuton, acid micofenolic, tacrolimus, sirolimus, amipriloză, cladribin, azaribin, budebozidă, factor de creștere epidermică, aminosalicilați, 6-mercaptopurină, metronidazol, inhibitori ai lipoxigenazei, mesalamină, olsalazină, balsalazidă, antioxidanți, inhibitori ai tromboxanului, antagoniști ai receptorului IL-1, anticorpi monoclonali anti-IL-1 β , anticorpi monoclonali anti-IL-6, factori de creștere, inhibitori ai elastazei, compuși piridinil-imidazolici, promedicamente glucuronid -conjugate ale prednisolonului, dexametazonei sau budezonidului, promedicamente dextran-conjugate ale prednisolonului, dexametrazonei sau budezonidului, receptor 1 complement solubil, mesalazină cu eliberare lentă, antagoniști ai factorului de activare a plachetelor (PAF), ciprofloxacina, lignocaină, prednisolon, metilprednisolon, ciclofosfamidă, 4-aminopiridină, tizanidină, interferon- β 1a, interferon- β 1b, copolimer 1, oxigen hiperbaric, imunoglobulină intravenoasă, clabribină, soluții saline hipertone, antibiotice, hemofiltrare continuă, carbapenem, antagoniști ai citokinelor, cum ar fi TNF α , IL-1 β , IL-6, și/sau IL-8, SK&F 107647, guanilhidrazonă tetravalentă CNI-1493, factor inhibitor al căii țesutului, PHP, chelatori de fier și chelați, incluzând un complex acid dietilentriamino-pentaacetic-fier (III), lizofilină, PGG-glucan, apolipoproteină A-1 reconstituită cu lipide, acizi chiral hidroxicami, anticorpi anti-endotoxină, E5531, rBPI₂₁, peptide sintetice anti-endotoxină, anticorpi terapeutici de înlocuire a surfactanților și anticorpi anti-IL-8.



15. Anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, derivatizat sau legat la cel puțin o moleculă funcțională, în care anticorpul uman disociază din TNF α uman cu o K_d de 1×10^{-8} M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC $_{50}$ de 1×10^{-7} M sau mai mică.

16. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 15, derivatizat sau legat la cel puțin o moleculă funcțională, în care anticorpul uman, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, are următoarele caracteristici:

a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

17. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 15, derivatizat sau legat la cel puțin o moleculă funcțională, în care anticorpul uman cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

18. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 15 la 17, în care molecula funcțională este



selectată din grupul constând dintr-un al doilea anticorp, un agent detectabil, un agent citotoxic, un agent farmaceutic și o proteină sau peptidă care poate să medieze asocierea anticorpului sau a porțiunii din anticorp cu altă moleculă.

19. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 18, în care agentul detectabil este selectat din grupul constând dintr-un compus fluorescent, o enzimă detectabilă și biotină.

20. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 19, în care compusul fluorescent este selectat din grupul constând din fluoresceină, izotiocianat de fluoresceină, rodamină, clorură de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonil și ficoeritrină.

21. Anticorp uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 19, în care enzima detectabilă este selectată din grupul constând din fosfatază alcalină, peroxidază din hrean și glucozoxidază.

22. Compoziție cuprinzând un polimer biocompatibil și un anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, care disociază din TNF α uman cu o K_d de 1×10^{-8} M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață, și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC_{50} de 1×10^{-7} M sau mai mică.

23. Compoziție conform revendicării 22, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, are următoarele caracteristici:

a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin testul de rezonanță a plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură



substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

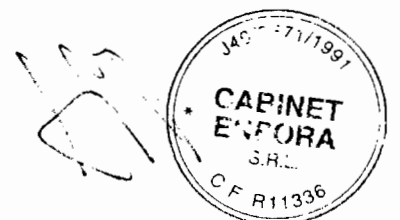
24. Compoziție conform revendicării 22, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

25. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările 22 la 24, în care polimerul biocompatibil este selectat din grupul constând din acetat de etilen vinil, polianhidride, acid poliglicolic, colagen, poliortoesteri and acid polilactic.

26. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările 22 la 24, în care polimerul biocompatibil este biodegradabil.

27. Compoziție cuprinzând un agent care întârzie absorbția și un anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, care disociază din TNF α uman cu o K_d de 1×10^{-8} M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC $_{50}$ de 1×10^{-7} M sau mai mică.

28. Compoziție conform revendicării 27, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, are următoarele caracteristici:



a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

29. Compoziție conform revendicării 27, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

30. Compoziție cuprinzând un purtător care împiedică eliberarea rapidă și un anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, care disociază din TNF α uman cu o K_d de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață, și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC_{50} de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ sau mai mică.

31. Compoziție conform revendicării 30, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, are următoarele caracteristici:

a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură

substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11 sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

32. Compoziție conform revendicării 30, în care anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

33. Fragment Fd sau F(ab')₂ al unui anticorp uman izolat caracterizat prin aceea că, anticorpul disociază din TNF α uman cu o K_d de 1 x 10⁻⁸ M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1 x 10⁻³ s⁻¹ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață, și neutralizează citotoxicitatea TNF α uman într-un test standard *in vitro* L929 cu IC₅₀ de 1 x 10⁻⁷ M sau mai mică.

34. Fragment Fd sau F(ab')₂ conform revendicării 33, în care anticorpul uman izolat are următoarele caracteristici:

a) disociază din TNF α uman cu o constantă a ratei K_{off} de 1 x 10⁻³ s⁻¹ sau mai mică, așa cum s-a determinat prin rezonanța plasmonului de suprafață;

b) are un domeniu CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID NR.: 3 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9;

c) are un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11, sau prin una până



la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

35. Fragment Fd sau F(ab')₂ conform revendicării 33, în care anticorpul uman izolat cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare (LCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1 și o regiune variabilă a catenei grele (HCVR) cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

36. Anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, care disociază din TNF α uman cu o K_d de 1 x 10⁻⁸ M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1 x 10⁻³ s⁻¹ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață, și neutralizează activarea celulară indusă de TNF α într-un test standard *in vitro* pentru expresia ELAM-1 indusă de TNF α pe o celulă endotelială a venei ombilicale umane (HUVEC).

37. Anticorp uman izolat, sau o porțiune a acestuia care se leagă la antigen, care disociază din TNF α uman cu o K_d de 1 x 10⁻⁸ M sau mai mică și o constantă a ratei K_{off} de 1 x 10⁻³ s⁻¹ sau mai mică, ambele determinate prin rezonanța plasmonului de suprafață și inhibă legarea TNF α uman pe ambii receptori p55 și p75 ai TNF α uman.

38. Acid nucleic izolat cuprinzând SEQ ID NR.: 36.

39. Acid nucleic izolat cuprinzând SEQ ID NR.: 37.

40. Compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul uman izolat, sau porțiunea acestuia care se leagă la antigen, conform revendicării 38 sau 39 și un purtător acceptabil farmaceutic.

41. Acid nucleic izolat care codifică domeniul CDR3 al catenei ușoare cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 3, sau modificată din SEQ ID



NR.: 3 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 1, 4, 5, 7 sau 8, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 1, 3, 4, 6, 7, 8 și/sau 9.

42. Acid nucleic izolat conform revendicării 41, care codifică o regiune variabilă a catenei ușoare a anticorpului (LCVR).

43. Acid nucleic izolat conform revendicării 42, în care domeniul CDR2 al anticorpului LCVR cuprinde secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 5.

44. Acid nucleic izolat conform revendicării 42, în care domeniul CDR1 al anticorpului LCVR cuprinde secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 7.

45. Acid nucleic izolat care codifică un domeniu CDR3 al catenei grele cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 4, sau modificată din SEQ ID NR.: 4 printr-o singură substituție a alaninei în poziția 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 sau 11, sau prin una până la cinci substituții de aminoacizi conservatoare în pozițiile 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 și/sau 12.

46. Acid nucleic izolat conform revendicării 45, care codifică o regiune variabilă a catenei grele a anticorpului (HCVR).

47. Acid nucleic izolat conform revendicării 46, în care domeniul CDR2 al anticorpului HCVR cuprinde secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 6.

48. Acid nucleic izolat conform revendicării 46, în care domeniul CDR1 al anticorpului HCVR cuprinde secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 8.

49. Acid nucleic izolat care codifică un domeniu CDR3 cuprinzând o secvență de aminoacid selectată din grupul constând din SEQ ID NR.: 11, SEQ ID NR.: 12, SEQ ID NR.: 13, SEQ ID NR.: 14, SEQ ID NR.: 15, SEQ ID NR.: 16,



SEQ ID NR.: 17, SEQ ID NR.: 18, SEQ ID NR.: 19, SEQ ID NR.: 20, SEQ ID NR.: 21, SEQ ID NR.: 22, SEQ ID NR.: 23, SEQ ID NR.: 24, SEQ ID NR.: 25, SEQ ID NR.: 26, SEQ ID NR.: 27, SEQ ID NR.: 28, SEQ ID NR.: 29, SEQ ID NR.: 30, SEQ ID NR.: 31, SEQ ID NR.: 32, SEQ ID NR.: 33 și SEQ ID NR.: 34.

50. Acid nucleic izolat care codifică o regiune variabilă a catenei ușoare a anticorpului cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1.

51. Acid nucleic izolat conform revendicării 50, care codifică regiunea variabilă a catenei ușoare a anticorpului și o regiunea constantă a catenei ușoare a anticorpului.

52. Acid nucleic izolat conform revendicării 51, care este într-un vector de expresie recombinant.

53. Acid nucleic izolat care codifică o regiune variabilă a catenei grele a anticorpului cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

54. Acid nucleic izolat conform revendicării 53, care codifică regiunea variabilă a catenei grele a anticorpului și o regiunea constantă a catenei grele a anticorpului.

55. Acid nucleic izolat conform revendicării 54, în care regiunea constantă a catenei grele a anticorpului este o regiune constantă IgG1 sau o regiune constantă IgG4.

56. Acid nucleic izolat conform revendicării 54, care este într-un vector de expresie recombinant.

57. Vector de expresie recombinant care codifică:



a) o catenă ușoară a unui anticorp având o regiune variabilă cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 1; și

b) o catenă grea a unui anticorp având o regiune variabilă cuprinzând secvența de aminoacid a SEQ ID NR.: 2.

58. Celulă gazdă caracterizată prin aceea că, în aceasta s-a introdus vectorul de expresie recombinant conform revendicării 57.

59. Procedeu de sinteză a unui anticorp uman care leagă TNF α uman, caracterizat prin aceea că, acesta cuprinde cultivarea celulei gazdă, conform revendicării 58, într-un mediu de cultură până când celula sintetizează un anticorp uman care leagă TNF α uman.



LISTA DE SECVENȚE

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ:

(i) SOLICITANT:

- (A) NUME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRADA: Carl-Bosch Str. 38
- (C) ORAȘ: 67056 Ludwigshafen
- (D) STAT: Rheinland-Pfalz
- (E) ȚARĂ: Federal Republic of Germany

(ii) TITLUL INVENȚIEI: Anticorpi umani care se leagă la TNFa uman

(iii) NUMĂR DE SECVENȚE: 37

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:

- (A) ADRESANT: LAHIVE & COCKFIELD
- (B) STRADA: 60 State Street, suite 510
- (C) ORAȘ: Boston
- (D) STAT: Massachusetts
- (E) ȚARĂ: USA
- (F) COD POȘTAL: 02109-1875

(v) FORMĂ CITIBILĂ PE CALCULATOR:

- (A) TIP MEDIU: Floppy disk
- (B) COMPUTER: compatibil IBM PC
- (C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATE ALE CERERII CURENTE:

- (A) NUMĂRUL CERERII:
- (B) DATA DEPUNERII:
- (C) CLASIFICARE:

(vii) DATE ALE CERERII ANTERIOARE:

- (A) NUMĂRUL CERERII: US 08/599,226
- (B) DATA DEPUNERII: 9-FEB-1996
- (C) CLASIFICARE:

(viii) DATE ALE CERERII ANTERIOARE:

- (A) NUMĂRUL CERERII: US 60/031,476



(B) DATA DEPUNERII: 25-NOV-1996

(C) CLASIFICARE:

(viii) INFORMAȚIE AGENT/MANDATAR:

(A) NUME: DeConti, Giulio A., Jr.

(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 31,503

(C) NUMĂR DOSAR/REFERINȚĂ: BBI-043CPPC

(ix) INFORMAȚII PENTRU TELECOMUNICARE:

(A) TELEFON: (617)227-7400

(B) TELEFAX: (617)227-5941

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERISTICE DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 107 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:1:

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr



85

90

95

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

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 121 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:2:

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

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

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120



(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(ix) TRĂSĂTURA:

- (A) NUME/COD: Sit-modificat
- (B) LOCALIZARE: 9
- (D) ALTĂ INFORMAȚIE: /notă= "Xaa este Thr sau Ala"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 12 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

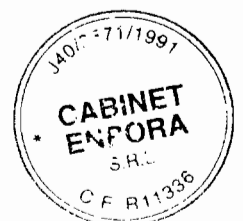
(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(ix) TRĂSĂTURA:

- (A) NUME/COD: Sit-modificat
- (B) LOCALIZARE: 12
- (D) ALTĂ INFORMAȚIE: /notă= "Xaa este Tyr sau Asn"

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:4:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa



1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 7 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIP MOLECULĂ: peptidă

(v) TIP FRAGMENT: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 17 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIP MOLECULĂ: peptidă

(v) TIP FRAGMENT: intern

(xi) DESCRIERE SECVENȚĂ: SEQ ID NO:6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:7:



(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 11 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIP MOLECULĂ: peptidă

(v) TIP FRAGMENT: intern

(xi) DESCRIERE SECVENȚĂ: SEQ ID NO:7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1

5

10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 5 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:8:

Asp Tyr Ala Met His

1

5

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

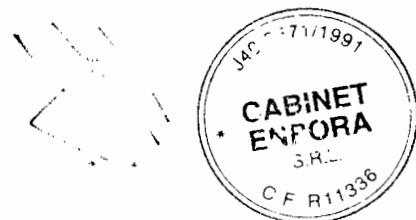
(A) LUNGIME: 107 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern



(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:9:

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

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

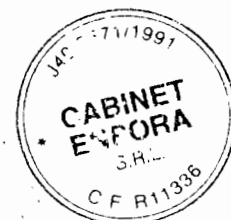
- (A) LUNGIME: 121 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:10:

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		



Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară



(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5



(2) INFORMAȚIA FOR SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SEQ ID NO:15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

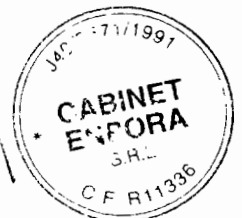
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară



(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5



(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERISTICI D ESECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară



(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

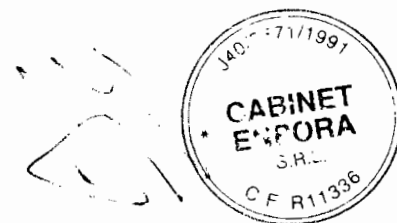
(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5



(2) INFORMAȚIA PENTRU SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:26:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 12 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară



(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 12 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 12 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:29:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10



(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:30:

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 12 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:30:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:31:

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 12 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:32:

- (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 12 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară



(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:33:

(i) CARACTERISTICI DE SCVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 12 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENRTU SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 12 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10



(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 12 aminoacizi
- (B) TIP: aminoacid
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(v) TIPUL FRAGMENTULUI: intern

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 321 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:36:

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC 60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA 120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT 180
CGGTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT 240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG 300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A 321



[Handwritten signature]

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NO 37:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 363 baze perechi
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: dublă
- (D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NO:37:

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT	120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT	180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG	360
AGT	363

