



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 041**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01961945 .1**

96 Fecha de presentación : **07.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1309693**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Anticuerpos anti-integrina dual, composiciones, métodos y usos.**

30 Prioridad: **07.08.2000 US 223363 P**
01.08.2001 US 920267

73 Titular/es: **CENTOCOR ORTHO BIOTECH Inc.**
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, Pennsylvania 19044, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2010

72 Inventor/es: **Giles-Komar, Jill;**
Heavner, George;
Snyder, Linda y
Trikha, Mohit

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2010

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 346 041 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-integrina dual, composiciones, métodos y usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluyendo porciones especificadas, específicos para la proteína integrina dual alfa-v-beta3 y alfa-v-beta5, así como los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos anti-integrina dual, los vectores, las células anfitrionas, y los métodos de elaboración y sus usos, incluidas las formulaciones y dispositivos terapéuticos.

10 **Técnica relacionada**

En la actualidad existen pruebas considerables de que el crecimiento tumoral progresivo depende de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para proporcionar a los tumores nutrientes y oxígeno, para eliminar productos de desecho y para actuar como conductos de la metástasis de las células tumorales a sitios distantes (Gastl *et al.* *Oncol.* 54:177-184). Estudios recientes han definido adicionalmente el papel de las integrinas en el proceso angiogénico. Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas que juegan papeles críticos en la adherencia celular a la matriz extracelular (MEC), que, a su vez, media la supervivencia, la proliferación y la migración celular a través de la señalización intracelular. Durante la angiogénesis, varias integrinas que se expresan en la superficie de las células endoteliales activadas regulan interacciones de adherencia críticas con una variedad de proteínas de MEC para regular distintos eventos biológicos tales como la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Específicamente, se ha demostrado que las integrinas estrechamente relacionadas pero distintas aVb3 y aVb5 median rutas independientes en el proceso angiogénico. Un anticuerpo generado contra $\alpha V\beta 3$ bloqueó la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), mientras que un anticuerpo específico contra $\alpha V\beta 5$ inhibió la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Eliceiri, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 103: 1227-1230 (1999); Friedlander *et al.*, *Science* 270: 1500-1502 (1995)).

Los anticuerpos policlonales (por ejemplo, anti-sueros) y/o monoclonales, quiméricos, de mamíferos no humanos, (Acm) y sus fragmentos (por ejemplo, sus productos de digestión proteolítica o proteínas de fusión) son agentes terapéuticos potenciales que están siendo investigados en algunos casos para intentar el tratamiento de ciertas enfermedades. Sin embargo, tales anticuerpos o fragmentos pueden provocar una respuesta inmunitaria cuando se administran a seres humanos. Tal respuesta inmunitaria puede dar lugar a un aclaramiento mediado por el complejo inmunitario de los anticuerpos o fragmentos de la circulación, y hacer la administración repetida no apta para la terapia, reduciendo así el beneficio terapéutico para el paciente y limitando la readministración del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la administración repetida de anticuerpos o fragmentos que comprenden porciones no humanas puede conducir a enfermedad del suero y/o anafilaxis. Con el fin de evitar estos y otros problemas, se han adoptado una serie de enfoques para reducir la inmunogenicidad de estos anticuerpos y sus porciones, incluyendo la quimerización y la humanización, también conocidas en la técnica. Estos y otros enfoques, sin embargo, todavía pueden dar lugar a anticuerpos o fragmentos con alguna inmunogenicidad, baja afinidad, baja avidéz, o con problemas en el cultivo celular, el aumento a escala, la producción y/o los bajos rendimientos. Por lo tanto, tales anticuerpos o fragmentos puede ser menores que los adecuados idealmente para la fabricación o utilización como proteínas terapéuticas.

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar anticuerpos o fragmentos anti-integrina dual que superen uno más de estos problemas, así como las mejoras sobre los anticuerpos conocidos o sus fragmentos.

El documento WO 00/31248 describe anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética o monoclonales recombinantes humanizados y otros, para receptores de integrina heterodiméricos que contienen la subunidad Alfa V humana. Se supone que tales anticuerpos son útiles para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades mediadas por estos receptores, tales como el cáncer.

Lehmann *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54(8): 2102-7 describe un anticuerpo monoclonal denominado 69-6-5 originado contra células HT29 de carcinoma de colon humano viables completas. Se supone que el anticuerpo reacciona con varias integrinas Alfa V e interfiere eficazmente en las funciones de adherencia de al menos Alfa V Beta 5 y Alfa V Beta 6.

Mitjans *et al.* (1995) *J Cell Sci.* 108(Pt 8): 2825-38 describe una serie de anticuerpos monoclonales de múrido originados contra la integrina Alfa V Beta 3 humana purificada y células de melanoma humano M21. Se supone que un anticuerpo, 17E6, perturba la unión celular mediada por integrinas Alfa V, e inhibe la unión celular a ligandos Alfa V de vitronectina y fibronectina.

60 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos anti-integrina dual humanos aislados y sus porciones especificadas, así como composiciones de anticuerpo anti-integrina dual, ácidos nucleicos que los codifican, vectores, células anfitrionas, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos no humanos, plantas transgénicas, y métodos de elaboración y sus usos, tal como se describe y se posibilita en la presente memoria, combinado con lo que se conoce en la técnica.

En particular, la presente invención proporciona el anticuerpo o su fragmento de las reivindicaciones 1-10.

La presente invención también proporciona la composición de las reivindicaciones 11-12, el ácido nucleico de las reivindicaciones 13-15, la célula anfitriona de las reivindicaciones 16-17, el método de la reivindicación 18, el animal de la reivindicación 19; el uso de las reivindicaciones 20-27 y 14-25, el medicamento de la reivindicación 23, el artículo de las reivindicaciones 26-27, el dispositivo de la reivindicación 28, el animal o vegetal de la reivindicación de 29 y el método de la reivindicación 30.

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede comprender opcionalmente al menos una sustitución inserción o deleción especificadas tal como se describe en la presente memoria o como se conoce en la técnica.

La presente memoria también describe al menos un anticuerpo anti-integrina dual aislado como se describe a continuación, donde el anticuerpo tiene al menos una actividad, tal como, pero no limitada a la inhibición de la unión a vitronectina, la inhibición de la unión de alfa-v beta-3 a al menos uno de un ligando o receptor de alfa-v beta-3, la inhibición de la unión de alfa-v-beta-5 a al menos uno de un ligando o receptor de alfa-v beta-5, la modulación de la angiogénesis, la unión a células que expresan una integrina dual o una integrina sencilla. De ese modo se puede escrutar un anticuerpo anti-integrina dual en busca de la actividad correspondiente de acuerdo con los métodos conocidos, tales como, pero no limitados a; al menos una actividad biológica hacia una proteína integrina dual.

La presente memoria describe en un aspecto, moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden, un polinucleótido de codifica al menos un anticuerpo anti-idiotipo de integrina dual complementario o hibridante, que comprende al menos una secuencia especificada, dominio, porción o variante de la misma. La especificación descrita adicionalmente proporciona vectores recombinantes que comprenden dicho anticuerpo anti-idiotipo de integrina dual que codifica las moléculas de ácido nucleico, las células anfitrionas que contienen tales ácidos nucleicos y/o los vectores recombinantes, así como los métodos de fabricación y/o uso de tales ácidos nucleicos del anticuerpo anti-idiotipo, vectores y/o células anfitrionas.

La presente memoria describe al menos un método para expresar al menos un anticuerpo anti-integrina dual o un anticuerpo anti-idiotipo de integrina dual, en una célula anfitriona, que comprende cultivar una célula anfitriona, como se ha descrito en la presente memoria en condiciones en las que al menos un anticuerpo anti-integrina dual se expresa en condiciones detectables y/o recuperables.

La presente invención también proporciona al menos una composición que comprende (a) un anticuerpo aislado como se describe en la presente memoria, y (b) un portador o diluyente adecuados. El portador o diluyente opcionalmente pueden ser farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con los portadores o diluyentes conocidos. Opcionalmente la composición puede comprender adicionalmente al menos un compuesto, proteína o composición adicionales.

En la presente memoria se describe adicionalmente al menos un método o composición de anticuerpos anti-integrina dual, para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz para modular o tratar al menos una afección relacionada con una integrina dual en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes, después, o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente memoria.

La presente memoria describe adicionalmente al menos una composición, dispositivo y/o método de liberación de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-integrina dual, de acuerdo con la presente invención.

La presente memoria describe adicionalmente al menos un método o composición de anticuerpos anti-integrina dual, para el diagnóstico de al menos una afección relacionada con la integrina dual en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes, después, o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente memoria.

La presente memoria describe adicionalmente al menos una composición, dispositivo y/o método de liberación para el diagnóstico de al menos un anticuerpo anti-integrina dual, de acuerdo con la presente invención.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un gráfico de diluciones a la mitad de anticuerpos monoclonales (Acm) anti- $\alpha V\beta 3$ incubados en placas recubiertas con $\alpha V\beta 3$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron dos veces y se sondearon con anticuerpo específico anti-kappa IgG humana de cabra marcada con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo, se desarrollaron con el sustrato OPD y se midió la DO a 490 nm.

La Figura 2 muestra un gráfico de células M21 marcadas con calceína preincubadas con muestras de anticuerpos en ausencia o presencia de P1F6, ascitis anti- $\alpha V\beta 5$ durante 30 minutos, después se añadieron a placas recubiertas con vitronectina durante 45 minutos. Las células M21 no unidas se separaron con dos lavados de 150 μ L/pocillo con HBSS con calcio. La placa se leyó en un fluorómetro a 485-538 nm.

La Figura 3 muestra un gráfico de la adherencia celular donde las células MDAM8435L2 se cosecharon y preincubaron con diferentes concentraciones de GenO95 durante 10 minutos. Después se añadieron células tumorales a

5 placas Linbro recubiertas con vitronectina y se incubaron a 37°C durante una hora. Los pocillos se lavaron tres veces y se añadió colorante Cell Titer AQ basado en MTT a cada pocillo. La adherencia celular se determinó en un lector de placas ELISA donde la DO490 nm es directamente proporcional a la adherencia celular. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo (datos no mostrados). Cada dato puntual es la media de las determinaciones por triplicado.

10 Las Figuras 4A-D muestran los gráficos de unión del anticuerpo a $\alpha V\beta 3$ donde este ligando se preincubó en diluciones a la mitad partiendo de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con EDTA 50 mM en USA-HBSS al 1% (en ausencia de Ca^{++}) o con BSA-HBSS al 1% (con Ca^{++}) durante 30 minutos, 37°C. Las mezclas se añadieron a las placas recubiertas con IgG CNTO 95, C372, c7E3 o LM609 y se incubaron durante 1 hora, 37°C. LM609 o CNTO 95 se añadieron a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón adecuado (+/- Ca^{++}) durante 30 min, 37°C. Las placas se sondearon con Fc de cabra anti-IgG de ratón, HRP o Fc de cabra anti-IgG humana, HRP.

15 Las Figuras 4E-G muestran gráficos de la unión de anticuerpos a un $\alpha V\beta 5$, donde este ligando se preincubó en diluciones a la mitad partiendo de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con EDTA 50 mM en BSA-HBSS al 1% (en ausencia de Ca^{++}) o con BSA-HBSS al 1% (con Ca^{++}) durante 30 min, 37°C. Las mezclas se añadieron a las placas recubiertas con IgG CNTO 95, C372, c7E3 y se incubaron durante 1 hora, 37°C. VNR139 se añadió a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón adecuado (+/- Ca^{++}) durante 30 min, 37°C. Las placas se sondearon con Fc de cabra anti-IgG de ratón, HRP.

20 La Figura 5A-B muestra un gráfico de la curva de saturación de la unión de GenO.95 (Fig. 5A) y ReoPro (Fig. 5B) en placas recubiertas con $\alpha v\beta 3$.

25 Figura 12. Inmunofluorescencia y citometría de flujo. El histograma de la izquierda representa la fluorescencia de fondo en presencia de anticuerpos de isotipo coincidente. El histograma de la derecha indica una tinción positiva. A, D, G, LM609 (AcM dirigidos a $\alpha v\beta 3$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); B, E, H, P1F6 (AcM dirigidos a $\alpha v\beta 5$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y C, F, I, GenO95 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

30 Figura 13. Adherencia de HUVEC a placas recubiertas de proteínas de la matriz. El ensayo de adherencia se realizó como se describe en los Métodos del Ejemplo 5. La placa se leyó en un fluorómetro a 485-538 nm. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. En la Figura 13, el grado de adherencia celular en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos se trazó como el porcentaje de la adherencia celular en ausencia de anticuerpo que se consideró como 100%. Cada dato puntual es la media de las determinaciones por triplicado (+/- DT).

35 Figura 14. Adherencia de células de melanoma humano a placas recubiertas con proteínas de la matriz. El ensayo de adherencia se realizó como se describe en Métodos. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. En la Figura 14 el grado de adherencia celular en presencia de varias concentraciones de anticuerpos se trazó como el porcentaje de adherencia celular en ausencia de anticuerpo que se consideró como 100%. Cada dato puntual es la media de las determinaciones por triplicado (+/- DT).

40 Figura 15. Adherencia de células HT29 de carcinoma de colon humano a vitronectina. El ensayo de adherencia se realizó como se describe en Métodos. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. Los datos en la Figura 15 se trazan como el porcentaje de unión máxima (ausencia de anticuerpos), y son la media de determinaciones por triplicado (+/- DT).

45 Figura 16A-D. Migración de HUVEC hacia vitronectina de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El ensayo se realizó como se describe en Métodos y se permitió que las células migraran durante 6 h. Las fotomicrografías son campos (lentes de objetivo 10x) representativos de migración celular en la Figura 16A, ausencia de anticuerpos, (16B), GenO95 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (16C), GenO95 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La Figura 16D es la representación gráfica de la migración celular en presencia de concentraciones variables de GenO95. Los datos se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideró como 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT).

50 Figura 17. Migración de HUVEC hacia vitronectina de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en presencia de anticuerpos contra $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. El ensayo de migración se llevó a cabo como se describe en Métodos, y se permitió que las células migraran durante 6 horas. LM609 y P1F6 son AcM dirigidos a $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, respectivamente. Los datos mostrados en la Figura 17 se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideró como 100%, y cada barra es la media de tres filtros Transwell (+/- DT). La BSA, la IgG de ratón y la IgG humana sirvieron como controles negativos. LM609-P1F6 representa una combinación de ambos anticuerpos. Los anticuerpos y la BSA se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

60 Figura 18A-E. Migración de HUVEC hacia FBS al 2%. Se permitió que el ensayo de migración prosiguiera durante 4 h y los datos se capturaron como se describe en Métodos. La Figura 18(A) es una representación gráfica de la migración celular en presencia del LM609, P1F6, combinación de LM609 + P1F6, anticuerpos de control de isotipo coincidente (humanos y de ratón). Los anticuerpos y las proteínas se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La Figura 18(B) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de ReoPro y GenO95. Las fotomicrografías son campos (lente del objetivo 10x) representativos de migración celular en la Figura 18(C), ausencia de anticuerpos, Figura 18(D), GenO95 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y Figura 18(E), GenO95 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los datos se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideró como 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT).

ES 2 346 041 T3

Figura 19A-E. Migración de las células A375S.2 hacia FBS al 10%. Se permitió que el ensayo de migración prosiguiera durante 4 h y los datos fueron capturados como se describe en Métodos. Los anticuerpos fueron utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 19(A) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de concentraciones variables de GenO95. La Figura 19(B) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de LM609, P1F6, combinación de LM609 + P1F6, anticuerpos de control de isotipo coincidente (humanos y de ratón). Los datos se normalizaron al porcentaje de control, que se consideró como 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT). Las fotomicrografías son campos (lente del objetivo 10x) representativos de la migración celular en la Figura 19(C), ausencia de anticuerpos, Figura 19 (D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y Figura 19 (E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 20A-E. Migración de HUVEC hacia vitronectina en presencia de *fb*FGF. Las partes inferiores de los filtros de la cámara de migración se recubrieron con vitronectina de 2 $\mu\text{g/ml}$, y el ensayo se realizó como se describe en Métodos. Se permitió que las células emigraran durante 6 h. En la Figura 20A-E, cada dato puntual es la media de 3 filtros Transwell (+/- DT). Figura 20 (A), *b*FGF, Figura 20(B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), Figura 20(C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$), Figura 20(D), sin *b*FGF. Figura 20(E), la inhibición de la migración de las células en presencia de varios anticuerpos se muestra gráficamente.

Figura 21A-D. Invasión de células A375S.2 a través de un gel de fibrina (5 mg/ml). Se permitió que el ensayo de invasión prosiguiera durante 24 h y los datos fueron capturados como se describe en Métodos. Las fotomicrografías son campos (lente del objetivo 4x) representativos de invasión celular en la Figura 21(A) en ausencia de anticuerpos, Figura 21(B) GenO95 (10 $\mu\text{g/ml}$), la Figura 21(C) y (D) son la representación gráfica de la invasión celular en presencia de GenO95, F(ab')₂, 10E5, LM609, P1F6, LM-P1F6 (LM609 + P1F6), IgG humanas y de ratón (H-IgG y M-IgG). Gráfico de la Figura 21(D): La concentración de todos los anticuerpos y las proteínas es de 10 $\mu\text{g/ml}$. Los datos se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpos) que se consideró como 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT).

Descripción de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-integrina dual recombinantes y/o sintéticos aislados, así como composiciones y moléculas de ácido nucleico que los codifican que comprenden al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-integrina dual de la invención. La presente invención incluye adicionalmente, pero no está limitada a, los métodos de elaboración y usos de dichos ácidos nucleicos y anticuerpos, por ejemplo, en composiciones, métodos y dispositivos diagnósticos y terapéuticos.

Según se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-integrina dual alfa-v-beta3, alfa-v-beta5", "anticuerpo anti-integrina dual", "porción de anticuerpo anti-integrina dual", o "fragmento de anticuerpo anti-integrina dual" y/o "variante de anticuerpo anti-integrina dual" y similares incluyen cualquier molécula que contenga la proteína o el péptido que comprende al menos una porción de una inmunoglobulina, tal como, pero no limitada a al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una de sus porciones de unión al ligando, una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o la cadena ligera, una región marco, o cualquiera de sus porciones, o al menos una porción de un receptor de integrina dual o proteína de unión, que se puedan incorporar a un anticuerpo de la presente memoria. Opcionalmente tal anticuerpo afecta adicionalmente a un ligando específico, tal como, pero no limitado a, los que tal anticuerpo modula, disminuye, aumenta, suscita antagonismo, suscita agonismo, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, anula y/o interfiere al menos una actividad o unión de integrina dual, o una actividad o unión a los receptores de integrina dual, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. A modo de ejemplo no limitante, un anticuerpo anti-integrina dual adecuado, porción o variante especificadas se pueden unir al menos a una integrina dual, o sus porciones, variantes o dominios especificados. Un anticuerpo anti-integrina dual adecuado, porción, o variante especificados también pueden afectar opcionalmente al menos a una de las actividades o funciones de la integrina dual, tales como, pero no limitadas a, la síntesis de ARN, ADN o proteínas, la liberación de la integrina dual, la señalización del receptor de la integrina dual, la escisión de la integrina dual de la membrana, la actividad de la integrina dual, la producción y/o la síntesis de la integrina dual. El término "anticuerpo" tiene por objeto adicionalmente abarcar anticuerpos, fragmentos de la digestión, porciones especificadas y sus variantes, incluyendo miméticos de anticuerpos o comprender porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o la función de un anticuerpo o sus fragmentos o porciones especificadas, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla y sus fragmentos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión al antígeno que se unen a una integrina dual de mamífero. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a la integrina dual o sus porciones, incluyendo pero no limitados a fragmentos Fab (por ejemplo, mediante digestión con papaína), Fab' (por ejemplo mediante digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), facb (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular), (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, *supra*).

Estos fragmentos pueden ser producidos mediante digestión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos también pueden producirse en una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada aguas arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, se puede diseñar un gen combinado que codifica una porción de la cadena pesada F(ab')₂ para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diferentes porciones de anticuerpos pueden unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente todas las partes de la proteína (por ejemplo, la CDR, el marco, los dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), la bisagra, (V_L, V_H)) son sustancialmente no inmunogénicas en los seres humanos, sólo con cambios o variaciones mínimos en la secuencia. Del mismo modo, los anticuerpos designados de primates (monos, babuino, chimpancé, etc.), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster, etc.) y otros mamíferos designan tales anticuerpos específicos de especie, sub-género, género, sub-familia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Tales cambios o variaciones opcionalmente y preferiblemente conservan o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Así, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano o célula procariótica o eucariótica que sea capaz de expresar genes de inmunoglobulinas humanas reordenados funcionalmente (por ejemplo, la cadena pesada y/o la cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena sencilla, éste puede comprender un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina o de otros residuos de aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que estos péptidos conectores son de origen humano.

También se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para al menos una proteína integrina dual, la otra es para cualquier otro antígeno. Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión simultánea de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Naturaleza* 305:537 (1983)). Debido a la diversidad arbitraria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares, por ejemplo, en el documento WO 93/08829, las patentes de los Estados Unidos Núms., 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, el documento WO 91/00360, el documento WO 92/00373, el documento EP 03089, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991), Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

Los anticuerpos anti-integrina dual (también denominados anticuerpos contra integrina dual) de la presente invención, pueden estar caracterizados opcionalmente por su alta afinidad de unión a la integrina dual y opcionalmente y preferiblemente tienen baja toxicidad. En particular, son útiles un anticuerpo o un fragmento especificado de la invención, donde los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y el marco, individualmente y/o colectivamente, opcionalmente y preferiblemente poseen baja inmunogenicidad. Los anticuerpos que se pueden utilizar se caracterizan opcionalmente por su capacidad para tratar pacientes durante períodos prolongados con alivio de los síntomas medible y toxicidad baja y/o aceptable. La inmunogenicidad baja o aceptable y/o alta afinidad, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos alcanzados. “Baja inmunogenicidad” se define en la presente memoria como el aumento significativo de las respuestas de HAHA, HACA o HAMA en menos aproximadamente 75%, o preferiblemente menos de aproximadamente 50% de los pacientes tratados y/o aumento de títulos bajos en los pacientes tratados (menos de 300, preferiblemente menos de aproximadamente 100 medidos con un inmunoensayo enzimático de doble antígeno) (Elliott *et al.* *Lancet* 344:1125-1127 (1994)).

Utilidad

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden utilizar para la producción de al menos un anticuerpo anti-integrina dual o variante especificada del mismo, que puede ser utilizado para medir o surtir efecto en una célula, tejido, órgano o animal (incluidos mamíferos y seres humanos), para diagnosticar, verificar, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de, al menos una afección por integrina dual, seleccionada entre, pero no limitadas a, al menos uno de trastornos o enfermedades inmunitarios, trastornos o enfermedades cardiovasculares, trastornos o enfermedades infecciosos, malignos, y/o neurológicos, u otra afección relacionada con la integrina dual conocida o especificada.

Este método puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición o una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-integrina dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento, alivio, prevención o reducción de los síntomas; efectos o mecanismos. La cantidad eficaz puede comprender una cantidad de aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg por administración individual (por ejemplo, bolo), múltiple o continua, o para lograr una concentración en suero de 0,01-5.000 µg/ml de concentración en suero por administración individual, múltiple, o continua, o cualquier intervalo o valor efectivo en el mismo, como se realiza y determina utilizando los métodos ya conocidos, como se describe en la presente memoria o se conoce en las técnicas pertinentes.

Citas

Todas las publicaciones o patentes citadas en la presente memoria muestran el estado de la técnica en el momento de la presente invención y/o proporcionan la descripción y la habilitación de la presente invención. Las publicaciones hacen referencia a cualquier publicación científica o de patente, o cualquier otra información disponible en cualquier formato de medio, incluyendo todos los formatos electrónicos o impresos registrados. Las siguientes referencias se citan específicamente: Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Anticuerpos de la presente invención

Al menos un anticuerpo anti-integrina dual de la presente invención puede ser producido opcionalmente por una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o un población clonal de células inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Los anticuerpos humanos que son específicos para las proteínas integrinas duales o sus fragmentos se pueden originar contra un antígeno inmunogénico adecuado, tal como una proteína integrina aislada y/o dual o una de sus porciones (incluyendo las moléculas sintéticas, tales como los péptidos sintéticos). Se pueden originar de un modo similar otros anticuerpos de mamífero específicos o generales. La preparación de antígenos inmunogénicos, y la producción de anticuerpos monoclonales se pueden realizar utilizando cualquier técnica adecuada.

En un enfoque, se produce un hibridoma por la fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no limitada a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS 1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, o similar, o heteromiomas, sus productos de fusión, o cualquier célula o célula de fusión derivada de allí, o cualquier otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y similares, con células productoras de anticuerpo, tales como, pero no limitadas a, células de bazo, sangre periférica, ganglios linfáticos, amígdalas, u otras células que contengan células inmunitarias o células B aisladas o clonadas, u otras células cualesquiera que expresen secuencias constantes o variables de la cadena pesada o ligera o secuencias marco o secuencias CDR, en forma de ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN viral, bacteriano, algal, procariótico, de anfibios, insectos, reptiles, mamíferos, roedores, equino, de óvulo, caprino, ovino, de primate, eucariótico, genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, mono-, di- o tricatenario, hibridado, recombinante o endógeno, y similares o cualquiera de sus combinaciones. Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, y Colligan, *Immunology, supra*, capítulo 2.

Las células productoras de anticuerpos también se pueden obtener de la sangre periférica o, preferiblemente de bazo o ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que hayan sido inmunizados con el antígeno de interés. También se puede utilizar cualquier otra célula anfitriona apropiada para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, un fragmento especificado o una de sus variantes, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o las células recombinantes se pueden aislar utilizando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos adecuados conocidos, y clonar mediante dilución limitante o clasificación de células, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

Se pueden utilizar otros métodos apropiados para la producción o el aislamiento de anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, pero no limitados a, los métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes a partir de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitados a, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc, o similares, biblioteca de presentación; por ejemplo, como la disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 368.684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4.704.692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); o los péptidos o proteínas generados estocásticamente - los documentos US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 5590 689 (Ixsys, now Applied Molecular Evolution (AME)), o los basados en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 41:901-907 (1997); Sandhu *et al.*, *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118 (1996); Eren *et al.*, *Immunol.* 93:154-161 (1998))

que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente memoria. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la presentación en ribosomas (Hanes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (Mayo de 1997); Hanes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); tecnologías de producción de anticuerpos de una sola célula (por ejemplo, el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (“SLAM”) (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052, Wen *et al.*, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgotas de gel y citometría de flujo (Powell *et al.* Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray *et al.*, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny *et al.*, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); selección de células B (Steenbakkers *et al.* Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak *et al.*, Progress Biotech, Vol. 5, *In Vitro* Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Países Bajos (1988)).

También se pueden utilizar métodos para diseñar o humanizar anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Por lo general, un anticuerpo humanizado o diseñado tiene uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitada a ratones, ratas, conejos, primates no humanos y otros mamíferos. Estos residuos de aminoácidos humanos son referidos a menudo como residuos “importados”, que se toman típicamente de un dominio variable, constante u otro “importado” de una secuencia humana conocida. Se describen secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, en

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;
www.atcc.org/phage/hdb.html;
www.sciquest.com/;
www.abcam.com/;
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;
www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html;
www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uklaxp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
www.isacnet.org/sites_geo.html;
aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm;
www.patents.ibm.com/libm.html.
Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983).

Estas secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, aumentar o modificar la unión, la afinidad, la asociación, la disociación, la avidéz, la especificidad, la vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En general, parte o la totalidad de las secuencias CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no-humanas de las regiones variables y constantes se reemplazan por aminoácidos humanos u otros. Los anticuerpos también se pueden humanizar opcionalmente con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, se pueden preparar opcionalmente anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diferentes productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles habitualmente y son familiares

para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidato seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados a partir de las secuencias consenso e importadas de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como el aumento de afinidad hacia el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de la CDR están implicados directamente y muy sustancialmente para influir en la unión al antígeno. La humanización o el diseño de anticuerpos de la presente invención se puede realizar usando cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a los descritos por, Winter (Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), las Patentes de los Estados Unidos Núms.: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, los documentos PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246.

El anticuerpo anti-integrina dual también se puede generar opcionalmente mediante inmunización de un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano, y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, tal como se describe en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica. Las células que producen un anticuerpo anti-integrina dual humano puede ser aisladas de estos animales e inmortalizadas con métodos adecuados, como los métodos descritos en la presente memoria.

Los ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que se unen a antígenos humanos pueden ser producidos mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero no limitados a, las Patentes de los Estados Unidos Núms.: 5.770.428, 5.569.825, 5.545.806, 5.625.126, 5.625.825, 5.633.425, 5.661.016 y 5.789.650 expedida a Lonberg *et al.*; Jakobovits *et al.* documento WO 98/50433, Jakobovits *et al.* documento WO 98/24893, Lonberg *et al.* documento WO 98/24884, Lonberg *et al.* documento WO 97/13852, Lonberg *et al.* documento WO 94/25585, Kucherlapate *et al.* documento WO 96/34096, Kucherlapate *et al.* documento EP 0463 151 B1, Kucherlapate *et al.* documento EP 0710 719 A1, Surani *et al.* Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807, Bruggemann *et al.* documento WO 90/04036, Bruggemann *et al.* documento EP 0438 474 B1, Lonberg *et al.* documento EP 0814 259 A2, Lonberg *et al.* documento GB 2 272 440 A, Lonberg *et al.* Nature 368:856-859 (1994), Taylor *et al.* Int. Immunol. 6 (4):579-591 (1994), Green *et al.*, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Méndez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor *et al.*, Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg *et al.* Immunol Rev Int 13(1):65-93 (1995) y Fishwald *et al.*, Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996)). En general, estos ratones comprenden al menos un transgen que comprende ADN de al menos un locus de inmunoglobulina humana que está reordenado funcionalmente, o que puede experimentar reordenamiento funcional. Los loci de inmunoglobulina endógena en tales ratones se puede interrumpir o suprimir para eliminar la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por los genes endógenos.

El escrutinio de anticuerpos en busca de unión específica a proteínas o fragmentos similares se puede lograr convenientemente utilizando bibliotecas de presentación de péptidos. Este método implica el escrutinio de grandes colecciones de péptidos en busca de miembros individuales que tengan la función o la estructura deseada. El escrutinio con anticuerpos de bibliotecas de presentación de péptidos es bien conocido en la técnica. Las secuencias peptídicas presentadas pueden tener de 3 a 5.000 aminoácidos o más de longitud, con frecuencia 5 a 100 aminoácidos de longitud, y a menudo de aproximadamente 8 a 25 aminoácidos de longitud. Además de los métodos de síntesis química directos para la generación de bibliotecas de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN recombinante. Un tipo implica la presentación de una secuencia del péptido en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica presentada concreta. Estos métodos se describen en las Publicaciones de Patente PCT Núms. 91/17271, 91/18980, 91/19818, Y 93/08278. Otros sistemas para la generación de bibliotecas de péptidos tienen aspectos tanto de la síntesis química *in vitro* como de los métodos recombinantes. Véanse, las Publicaciones de Patente PCT Núms. 92/05258, 92/14843, y 96/19256. Véanse también, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.658.754; y 5.643.768. Las bibliotecas de presentación de péptidos, los vectores y los kits de escrutinio están disponibles en el mercado de proveedores tales como Invitrogen (Carlsbad, CA), y Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido). Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 571698, 5837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax; 5885793, cedida a Cambridge antibody Technologies; 5750373, cedida a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedidas a Xoma, Colligan, *supra*; Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden preparar utilizando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-integrina dual para proporcionar animales o mamíferos transgénicos no humanos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Estos animales se pueden proporcionar utilizando métodos conocidos. Véanse, por ejemplo, pero no limitados a, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; 5.304.489, y similares.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar adicionalmente utilizando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-integrina dual para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas

(por ejemplo, pero no limitadas a tabaco y maíz) que producen tales anticuerpos, porciones o variantes especificadas en las partes de la planta o en las células cultivadas de allí. A modo de ejemplo no limitante, las hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes se han utilizado con éxito para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, utilizando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer *et al.* Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999) y referencias allí citadas. Además, el maíz transgénico se ha utilizado para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comerciales, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) y referencias allí citadas. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas incluyendo fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.*, de Mol. Biol. 38:101-109 (1998) y la referencia allí citada. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención también pueden ser producidos a partir de plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999), Ma *et al.*, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma *et al.*, Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); y las referencias allí citadas.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir a la integrina dual humana con una amplia gama de afinidades (K_D). En una realización preferida, se puede unir opcionalmente al menos un Acm de la presente invención a una integrina dual humana con alta afinidad. Por ejemplo, un Acm humano se puede unir a una integrina dual humana con una K_D igual o inferior a aproximadamente 10^{-7} M, tal como, pero no limitada a, 0,1 a 9,9 (o cualquier rango o valor de allí) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o de cualquier rango o valor de allí.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Véanse, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); y los métodos descritos en la presente memoria). La afinidad medida de una interacción antígeno-anticuerpo particular puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH). Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, K_D , Y_a , K_d) se realizan preferiblemente con soluciones normalizadas de anticuerpos y antígenos, y un tampón normalizado tal como el tampón descrito en la presente memoria.

Moléculas de ácido nucleico

Con la información proporcionada en la presente memoria, tal como las secuencias de nucleótidos que codifican al menos 100% de los aminoácidos contiguos de los SEQ ID NOS: 7 y 8, o un vector depositado que comprende al menos una de estas secuencias, se puede obtener una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica al menos un anticuerpo anti-integrina dual utilizando los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención puede estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluyendo, pero no limitado a, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente, o cualquiera de sus combinaciones. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquiera de sus combinaciones. Cualquier porción de al menos una cadena de ADN o ARN puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena efectora, o puede ser la cadena no codificante, también conocida como cadena anti-sentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitadas a, al menos una porción específica de al menos un CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo, los SEQ ID NOS: 1-3) o una cadena ligera (por ejemplo los SEQ ID NOS: 4-6); moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia que codifica un anticuerpo o región variable anti-integrina dual (por ejemplo, los SEQ ID NOS: 7,8), y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas antes, pero que, debido a la degeneración del código genético, aún codifica al menos un anticuerpo anti-integrina dual como se describe en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. Por lo tanto, sería rutinario para un experto en la técnica generar tales variantes de ácido nucleico degeneradas que codifican los anticuerpos anti-integrina dual específicos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al. supra*. Los ejemplos no limitantes de las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen los SEQ ID NOS: 10, 11, 12, 13, 14, 15, correspondientes a los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico que codifica, respectivamente, CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC, CDR3 de LC, la región variable de HC y la región variable de LC.

Como se ha indicado en la presente memoria, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-integrina dual pueden incluir, pero no están limitadas a, las que codifican la propia secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo; la secuencia codificante del anticuerpo completo o una porción de la misma; la secuencia codificante de un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia codificante de al menos una señal líder o péptido de fusión, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, por ejemplo al menos un intrón, junto con

secuencias no codificantes, adicionales, incluyendo pero no limitadas a, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas, no traducidas que juegan un papel en la transcripción, la maduración del ARNm, incluyendo las señales de empalme y poliadenilación (por ejemplo - unión al ribosoma y estabilidad del ARNm); una secuencia codificante adicional que codifica aminoácidos adicionales, como los que proporcionan funcionalidades adicionales.

5 Por lo tanto, la secuencia que codifica un anticuerpo se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o porción de anticuerpo.

10 *Polinucleótidos que Hibridan Selectivamente con un Polinucleótido como el Descrito en la Presente Memoria*

La presente memoria describe ácidos nucleicos aislados que hibridan en condiciones de hibridación selectiva con un polinucleótido descrito en la presente memoria. Así, los polinucleótidos se pueden utilizar para aislar, detectar, y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden utilizar para identificar, aislar o amplificar clones parciales o completos en una biblioteca depositada. En algunos casos, los polinucleótidos son secuencias genómicas o de ADNc aisladas, o complementarias de otro modo, a ADNc de una biblioteca de ácido nucleico humano o de mamífero.

Preferiblemente, la biblioteca de ADNc comprende al menos 80% de secuencias completas, preferiblemente al menos 85% o 90% de secuencias completas, y más preferiblemente al menos 95% de secuencias completas. Las bibliotecas de ADNc se pueden normalizar para aumentar la representación de secuencias raras. Típicamente, pero no exclusivamente, se emplean condiciones de hibridación poco o moderadamente restrictivas con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida con respecto a las secuencias complementarias. Opcionalmente se pueden emplear condiciones moderadamente y altamente restrictivas para las secuencias de mayor identidad. Las condiciones poco restrictivas permiten la hibridación selectiva de las secuencias que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente 70% y se pueden emplear para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Opcionalmente, los polinucleótidos codificarán al menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Los polinucleótidos abarcan secuencias de ácido nucleico que se pueden emplear para la hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; Colligan, *supra*.

35 *Construcción de los ácidos nucleicos*

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden elaborar utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas de síntesis, (c) técnicas de purificación, o sus combinaciones, como es bien conocido en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, se puede insertar un sitio de clonación múltiple que comprende uno o más sitios para endonucleasas restricción en el ácido nucleico para ayudar al aislamiento del polinucleótido. Además, se pueden insertar secuencias traducibles para ayudar al aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención -excluyendo la secuencia codificante- es opcionalmente un vector, un adaptador, o un conector para la clonación y/o la expresión de un polinucleótido de la presente invención.

Se pueden añadir secuencias adicionales a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar a aislar el polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores, y conectores es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*)

55 *Métodos Recombinantes para Construir Ácidos Nucleicos*

Las composiciones de ácidos nucleicos aislados de la invención, tales como ARN, ADN, ADN genómico, o cualquiera de sus combinaciones, se pueden obtener de fuentes biológicas utilizando cualquiera de las numerosas metodologías de clonación conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se utilizan sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, en condiciones restrictivas, con los polinucleótidos de la presente invención para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de ADNc o ADN genómico. El aislamiento de ARN, y la construcción de librerías de ADNc y genómico, es bien conocido por los expertos normales en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*)

65

Escrutinio de Ácidos Nucleicos y Métodos de Aislamiento

Una biblioteca de ADNc o genómico se puede escrutar utilizando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tal como los descritos en la presente memoria. Las sondas se pueden utilizar para su hibridación con las secuencias de ADN genómico o de ADNc para aislar genes homólogos en los mismos o diferentes organismos. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear diversos grados de restricción de la hibridación en el ensayo; y pueden ser restrictivos la hibridación o el medio de lavado. En cuanto a las condiciones para que la hibridación se vuelva más restrictiva, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y la diana para que se produzca la formación del dúplex. El grado de restricción puede ser controlado por uno o más de la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturalizante tal como la formamida. Por ejemplo, la restricción de la hibridación se varía convenientemente cambiando la polaridad de la solución de reaccionante a través, por ejemplo, de la manipulación de la concentración de formamida en el intervalo de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) necesario para una unión detectable variará de acuerdo con la restricción del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente de 100%, o 70-100%, o cualquier intervalo o valor de allí. Sin embargo, debe entenderse que las variaciones de menor importancia en la secuencia de sondas y cebadores puede ser compensada por la reducción de la restricción de la hibridación y/o del medio de lavado.

Los métodos de amplificación del ARN o ADN son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención sin experimentación indebida, basándose en la enseñanza y los consejos presentados en la presente memoria.

Los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero están limitados a, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y los procesos de amplificación relacionados (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188, de Mullis *et al.*; 4.795.699 y 4.921.794 de Tabor, *et al.*; 5.142.033 de Innis; 5.122.464 de Wilson, *et al.*; 5.091.310 de Innis; 5.066.584 de Gyllensten, *et al.*; 4.889.818 de Gelfand, *et al.*; 4.994.370 de Silver, *et al.*; 4.766.067 de Biswas; 4.656.134 de Ringold) y la amplificación mediada por ARN que utiliza ARN anti-sentido para la secuencia diana como un molde para la síntesis de ADN bicatenario (Patente de los estados Unidos Núm. 5.130.238 de Malek, *et al.*, con el nombre comercial NASBA), (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*.)

Por ejemplo, se puede utilizar tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y los genes relacionados directamente a partir de bibliotecas de ADN genómico o ADNc. La PCR y otros métodos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas que se van a expresar, para elaborar ácidos nucleicos para utilizarlos como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en las muestras, para la secuenciación de ácido nucleico, o para otros fines. Los ejemplos de las técnicas suficientes para dirigir a los expertos en la técnica a través de métodos de amplificación *in vitro* se encuentran en Berger, *supra*, Sambrook, *supra*, y Ausubel, *supra*, así como en Mullis, *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4,683,202 (1987), e Innis, *et al.*, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Los kits disponibles en el mercado para la amplificación genómica mediante PCR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Adicionalmente, por ejemplo, se puede utilizar el gen de la proteína 32 de T4 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de los productos de la PCR larga.

Métodos de Síntesis para la Construcción de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también se pueden preparar mediante síntesis química directa mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, *supra*). La síntesis química produce generalmente un oligonucleótido de cadena sencilla, que puede ser convertido en ADN de doble cadena mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la cadena sencilla como molde. Los expertos en la técnica reconocerán que mientras que la síntesis química del ADN puede limitarse a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Casets de Expresión Recombinantes

La presente invención proporciona adicionalmente casets de expresión recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Se pueden utilizar una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, un ADNc o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo de la presente invención, para construir un casete de expresión recombinante que se puede introducir al menos en una célula anfitriona deseada. Un casete de expresión recombinante normalmente comprenderá un polinucleótido de la presente invención unido operablemente a secuencias reguladoras de iniciación de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula anfitriona deseada. Los promotores tanto heterólogos como no heterólogos -(es decir, endógenos) puede ser empleados para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención.

ES 2 346 041 T3

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados que sirven como promotor, intensificador, u otros elementos pueden ser introducidos en la posición apropiada (aguas arriba, aguas abajo o en el intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención de manera que regule al alza o a la baja la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, los promotores endógenos se pueden modificar *in vivo* o *in vitro* mediante mutación, delección y/o sustitución.

Vectores y Células Anfitrionas

La presente invención se refiere también a los vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, las células anfitrionas que son diseñadas genéticamente con los vectores recombinantes, y la producción de al menos un anticuerpo anti-integrina dual mediante técnicas recombinantes, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *supra*; Ausubel, *et al.*, *supra*.

Los polinucleótidos se pueden unir opcionalmente a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un anfitrión. Por lo general, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, éste puede ser empaquetado *in vitro* utilizando una línea de celular de empaquetamiento apropiada y después transducido en las células anfitrionas.

El inserto de ADN debe ser conectado operativamente a un promotor apropiado. Los constructos de expresión contendrán adicionalmente los sitios de iniciación de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para su traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá preferiblemente una iniciación de la traducción en el codón de inicio y de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) debidamente colocado en el extremo del ARNm que se va a traducir, prefiriéndose UAA y UAG para su expresión en células de mamíferos o eucariotas.

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente pero opcionalmente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no están limitados a, genes de resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.399.216; 4.634.665; 4.656.134; 4.956.288; 5.149.636; 5.179.017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico, o glutamina sintetasa (GS, Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.122.464; 5.770.359; 5.827.739) para cultivos celulares eucarióticos, y de resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias o procarionas. Los medios de cultivo y condiciones apropiados para las células anfitrionas anteriormente descritas son conocidos en la técnica. Los vectores adecuados resultarán evidentes para el experto en la técnica. La introducción de un constructo vector en una célula anfitriona puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Estos métodos se describen en la técnica, por ejemplo Sambrook, *supra*, Capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, *supra*, Capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Al menos un anticuerpo de la presente invención se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo las señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, especialmente aminoácidos cargados, al extremo N de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula anfitriona, durante la purificación, o durante la manipulación y almacenamiento posteriores. Además, los radicales peptídicos se pueden añadir a un anticuerpo de la presente invención para facilitar su purificación. Tales regiones pueden ser eliminadas antes de la preparación final de un anticuerpo o al menos uno de sus fragmentos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, *supra*, Capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, *supra*, Capítulos 16, 17 y 18.

Los expertos normales en la técnica están informados sobre los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención.

Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden expresar en una célula anfitriona activándolos (mediante manipulación) en una célula anfitriona que contiene el ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746, y 5.733.761.

Son ilustrativas de los cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, sus porciones o variantes especificadas, las células de mamíferos. Los sistemas de células de mamíferos a menudo estarán en forma de monocapas de células aunque también se pueden utilizar las suspensiones de células de mamífero o biorreactores. Se han desarrollado en la técnica varias líneas de células anfitrionas adecuadas capaces de expresar las proteínas glicosiladas intactas, e incluyen por ejemplo, las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), carbohidratos (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y el BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células Hep G2, P3X63 Ag. 8.653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa y similares, que son fácilmente asequibles de, por ejemplo, la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células anfitrionas preferidas incluyen células de origen linfoide tales como las células de mieloma y linfoma. Las células anfitrionas particularmente preferidas son las células P3X63Ag8.653 (nú-

mero de acceso ATCC CRL-580) y las células SP2/0-Ag14 (número de acceso ATCC CRL-1851). En una realización particularmente preferida, la célula recombinante es una célula P3X63Ab8.653 o SP2/0-Ag14.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir uno o más de las siguientes secuencias de control de la expresión, tales como, pero no limitadas a un origen de replicación; un promotor (por ejemplo, los promotores tardío o temprano de SV40, el promotor de CMV (Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.168.062; 5.385.839), un promotor de HSV-tk, un promotor de la PGK (fosfoglicerato quinasa), un promotor de de EF-1 alfa (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.266.491), al menos un promotor de la inmunoglobulina humana, un intensificador, y/o los sitios de procesamiento de la información, tales como los sitios de unión a los ribosomas, los sitios de empalme del ARN, los sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición de poli A del Ag T grande de SV40), y las secuencias de terminación de la transcripción. Véanse, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *supra*; Sambrook, *et al.*, *supra*. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o están disponibles, por ejemplo, en el Catálogo de la Colección de Cultivos Tipo Americana de Líneas Celulares e Híbridomas (www.atcc.org) u otras fuentes conocidas o comerciales.

Cuando se emplean células anfitrionas eucariotas, se incorporan típicamente al vector secuencias de poliadenilación o de terminación de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia de terminación es la secuencia del poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. También se pueden incluir secuencias para el empalme exacto del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, *et al.*, J. Virol. 45:773-781 (1983)). Además, se pueden incorporar al vector secuencias de genes para controlar la replicación en la célula anfitriona, como se conoce en la técnica.

Purificación de un anticuerpo

Se puede recuperar y purificar un anticuerpo anti-integrina dual de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo pero no limitados a, purificación de la proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxiapatita y la cromatografía en lectina. También se puede emplear cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, or *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, Capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos químicos de síntesis, y productos formados mediante técnicas recombinantes a partir de un anfitrión eucariótica, incluyendo, por ejemplo, células de levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del anfitrión empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede glicosilarse o puede no glucosilarse, prefiriéndose la glicosilación. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, *supra*, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, *Protein Science*, *supra*, Capítulos 12-14.

Anticuerpos Anti-Integrina Dual

Los anticuerpos aislados de la presente invención comprenden las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos definidas en la reivindicación 1 codificadas por cualquier polinucleótido adecuado. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno humano se unen la integrina dual humana y, de ese modo se neutraliza en parte o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo o una porción especificada del mismo, que parcialmente o preferiblemente neutraliza sustancialmente al menos una actividad biológica de al menos una proteína integrina dual o fragmento se puede unir a la proteína o al fragmento y de ese modo inhibir las actividades mediadas a través de la unión de la integrina dual al receptor de integrina dual o a través de otros mecanismos mediados por, o dependientes de, la integrina dual. Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpos neutralizadores" hace referencia a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de integrinas duales en aproximadamente 20-120%, preferiblemente en al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% o más, dependiendo del ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-integrina dual para inhibir una actividad dependiente de integrinas duales se evalúa preferiblemente mediante al menos un ensayo de proteína integrina dual o receptor adecuado, como se describe en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica. Un anticuerpo humano de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada de IgG o un fragmento definido, por ejemplo, al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de este tipo se pueden preparar mediante el empleo de un ratón transgénico u otros mamíferos no humanos transgénicos que comprenden al menos transgenes de una cadena humana ligera (por ejemplo, IgG, IgA e IgM (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$) como se ha descrito, y/o como se conoce en la técnica. En otra realización, el anticuerpo humano anti-integrina dual humana está formado por una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Al menos un anticuerpo de la invención se une al menos a un epítipo especificado específico para al menos una proteína, subunidad, fragmento, porción de integrina dual o cualquiera de sus combinaciones. El al menos un

ES 2 346 041 T3

epítopo puede comprender al menos una región de unión al anticuerpos que comprende al menos una porción de dicha proteína, cuyo epítopo comprende preferiblemente al menos una porción extracelular, soluble, hidrófila, externa o citoplásmica de dicha proteína. El al menos un epítopo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 1-3 aminoácidos para la porción especificada completa de aminoácidos contiguos de los SEQ ID NOS: 9, 16 o 17.

El anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la presente invención se define en la reivindicación 1.

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar uniendo químicamente entre sí las distintas partes (por ejemplo, las CDR, marco) del anticuerpo utilizando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo utilizando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante o utilizando cualquier otro método apropiado.

El anticuerpo anti-integrina dual de la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8. Los anticuerpos que se unen a la integrina dual humana y que comprenden una región variable de la cadena pesada o ligera definida se pueden preparar utilizando métodos adecuados, tales como la presentación en fagos (Katsube, Y., *et al.* Int J Mol. Med, 1(5):863-868 (1998)) o los métodos que emplean animales transgénicos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, un ratón transgénico, que comprende un transgén de la cadena pesada de una inmunoglobulina humana reordenado funcionalmente y un transgén que comprende ADN de un locus de la cadena ligera de una inmunoglobulina humana que puede experimentar reordenamiento funcional, se puede inmunizar con una integrina dual humana o un fragmento de la misma para lograr la producción de anticuerpos. Si se desea, las células que producen el anticuerpo pueden ser aisladas y se pueden preparar hibridomas u otras células productoras de anticuerpos inmortalizadas como se describe en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo, la porción especificada o la variante se pueden expresar utilizando el ácido nucleico codificante o una porción del mismo en una célula anfitriona apropiada.

Una sustitución de aminoácidos conservativa hace referencia al reemplazo de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservativas incluyen el reemplazo de un aminoácido por otro en los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G), F, W e Y; C, S y T.

Códigos de Aminoácidos

Los aminoácidos que forman anticuerpos anti-integrina dual de la presente invención son a menudo abreviados. Las denominaciones de los aminoácidos se pueden indicar mediante la designación de los aminoácidos mediante su código de una sola letra, su código de tres letras, su nombre o los tres nucleótidos del codón o codones como es bien sabido en la técnica (véase Alberts, B. *et al.*, Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 346 041 T3

CÓDIGO DE UNA SOLA LETRA	CÓDIGO DE TRES LETRAS	NOMBRE	TRES NUCLEÓTIDOS DEL CODÓN O CODONES
A	Ala	Alanina	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Cisteína	UGC, UGU
D	Asp	Ácido aspártico	GAC, GAU
E	Glu	Ácido glutámico	GAA, GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC, UUU
G	Gly	Glicina	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Histidina	CAC, CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Lisina	AAA, AAG
L	Leu	Leucina	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparagina	AAC, AAU
P	Pro	Prolina	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA, CAG

ES 2 346 041 T3

CÓDIGO DE UNA SOLA LETRA	CÓDIGO DE TRES LETRAS	NOMBRE	TRES NUCLEÓTIDOS DEL CODÓN O CODONES
R	Arg	Arginina	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Serina	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Treonina	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Valina	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Triptófano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC, UAU

Un anticuerpo anti-integrina dual de la presente invención puede incluir una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, ya sea por mutaciones naturales o manipulación humana, tal como se especifica en la presente memoria.

Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos que realizaría un experto en la técnica depende de muchos factores, incluyendo los descritos anteriormente. En términos generales, el número de sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos para cualquier anticuerpo anti-integrina dual dado no serán más de 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, por ejemplo 1-30 o cualquier intervalo o valor en el mismo, tal como se especifica en la presente memoria.

Los aminoácidos en un anticuerpo anti-integrina dual de la presente invención que son esenciales para su función se pueden identificar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido con alanina (por ejemplo, Ausubel, *supra*, Capítulos 8, 15, Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Este último procedimiento introduce mutaciones únicas con alanina en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se someten después a ensayo en busca de actividad biológica, tal como, pero no limitada a al menos una actividad neutralizadora de integrina dual. Los sitios que son críticos para la unión del anticuerpo también pueden ser identificados mediante análisis estructural tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje de fotoafinidad (Smith, *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, *et al.*, Science 255:306-312 (1992)).

Como podrán apreciar los expertos en la técnica, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos 20%, 30% o 40%, y preferiblemente de al menos 50%, 60% o 70%, y más preferiblemente de al menos 80%, 90% o 95%-1.000% con respecto a la de los anticuerpos nativos (no sintéticos), endógenos o relacionados y conocidos. Los métodos para la determinación y cuantificación de las medidas de la actividad enzimática y la especificidad de sustrato, son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión al antígeno, como se describe en la presente memoria, que se modifican por la unión covalente de un radical orgánico. Tal modificación puede producir un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, aumento de la vida media en suero *in vivo*). El radical orgánico puede ser un grupo polimérico hidrófilo lineal o ramificado, un grupo ácido graso, o un grupo éster de ácido graso. En realizaciones particulares, el grupo polimérico hidrófilo puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 120.000 Daltons y puede ser un polialcanoglicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG)), polímero de carbohidrato, polímero de aminoácidos o polivinilpirrolidona, y el grupo ácido graso o éster de ácido graso puede comprender de aproximadamente ocho a aproximadamente a cuarenta átomos de carbono.

Los anticuerpos modificados y los fragmentos de unión al antígeno de la invención pueden comprender uno o más radicales orgánicos que se unen covalentemente, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada radical orgánico que

se une a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrófilo, un grupo ácido graso o un grupo éster de ácido graso. Según se utiliza en la presente memoria, el término “ácido graso” abarca los ácidos mono-carboxílicos y los ácidos di-carboxílicos. Un “grupo polimérico hidrófilo”, según se utiliza el término en la presente memoria, hace referencia a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. Así, un anticuerpo modificado por la unión covalente de polilisina está abarcado por la invención. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar los anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcanoglicoles (por ejemplo, PEG, monometoxipolietilenglicol (MPEG), PPG y similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de aminoácidos hidrófilos (p. ej., polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcanos (ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinilpirrolidona. Preferiblemente, el polímero hidrófilo que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150.000 Dalton como una entidad molecular separada. Por ejemplo se pueden utilizar PEG₅₀₀₀ y PEG_{20,000}, donde el subíndice es el peso molecular medio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrófilo puede estar sustituido con uno a seis grupos alquilo, ácido graso o éster de ácido graso. Los polímeros hidrófilos que están sustituidos con un grupo ácido graso o éster de ácido graso se pueden preparar mediante el empleo de métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo amino se puede acoplar a un carboxilato de ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonildiimidazol) de un ácido graso o éster de ácido graso se puede acoplar a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar los anticuerpos de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), *cis*- Δ 9-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos los *cis*- Δ 5,8,11,14-eicosatetraenoato (C₂₀, ácido araquidónico), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen mono-ésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, preferiblemente de uno a aproximadamente seis, átomos de carbono.

Los anticuerpos humanos modificados y los fragmentos de unión al antígeno se pueden preparar utilizando métodos adecuados, por ejemplo mediante reacción con uno o más agentes modificadores. Un agente “modificador” según se utiliza el término en la presente memoria, hace referencia a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, un polímero hidrófilo, un ácido graso, un éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un grupo “activador” es un radical químico o grupo funcional que puede, en determinadas condiciones, reaccionar con un segundo grupo químico formando de ese modo un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos activadores reactivos con amino incluyen grupos electrófilos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimido (NHS), y similares. Los grupos activadores que pueden reaccionar con los tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilóilo, disulfuros de piridilo, tiol de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (tiol-TNB), y similares. Un grupo aldehído funcional se puede acoplar a moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fósforo trivalente para uniones fosforamido o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos activadores en las moléculas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo activador se pueden unir directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrófilo, ácido graso, éster de ácido graso), o por medio de un radical conector, por ejemplo, un grupo C₁-C₁₂ divalente en el que uno o más átomos de carbono puede ser reemplazados por un heteroátomo tal como el oxígeno, el nitrógeno o el azufre. Los radicales conectores adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- y -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-. Los agentes modificadores que comprenden un radical conector se pueden producir, por ejemplo, por reacción de una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede separarse del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que se puede acoplar a otro carboxilato según se ha descrito, o se puede hacer reaccionar con anhídrido maleico y ciclar el producto resultante para producir un derivado maleimida activado del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson, *et al.*, documento WO 92/16221).

Los anticuerpos modificados de la invención se pueden producir haciendo reaccionar un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno humanos con un agente modificador. Por ejemplo, los radicales orgánicos se pueden unir al anticuerpo de una manera no específica del sitio por medio de un agente modificador reactivo con amina, por ejemplo, un éster de NHS de PEG. Los anticuerpos modificados o fragmentos de unión al antígeno humanos también se pueden preparar mediante la reducción de enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intracatenarios) de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno reducidos se pueden hacer reaccionar después con un agente modificador reactivo con tiol para producir el anticuerpo modificado de la invención. Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno humanos modificados que comprenden un radical orgánico que se une a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención se pueden preparar utilizando métodos adecuados, tales como proteólisis inversa (Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos por Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Composiciones de anticuerpos anti-integrina dual

La presente invención también proporciona al menos una composición de anticuerpo anti-integrina dual que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más anticuerpos anti-integrina dual, como se describe en la presente memoria y/o se conoce en la técnica que se proporcionan en una composición, mezcla o forma de origen no natural.

Las composiciones de anticuerpo anti-integrina dual de la presente invención pueden comprender adicionalmente al menos una de cualquier cantidad adecuada y eficaz de al menos de uno seleccionado de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o un fragmento de TNF, un receptor o fragmento soluble de TNF, sus proteínas de fusión, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxyclorequina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenemo, una cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un agente nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusígeno, un antiemético, un agente antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoyetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de la mitosis, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimanía, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una adrenalina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista o anticuerpo de citoquina. Los ejemplos no limitantes de tales citoquinas, incluyen, pero no están limitados a, cualquiera de IL-1 a IL-23, IL-6, anticuerpos anti-tumorales, agentes quimioterapéuticos o terapias de radiación. Las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2ª Edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Tales agentes anticancerosos o antiinfecciosos también pueden incluir moléculas de toxinas que se asocian, unen, formulan simultáneamente o administran simultáneamente con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede actuar opcionalmente para eliminar selectivamente las células o tejidos patológicos. La célula patológica puede ser una célula cancerosa u otra. Tales toxinas pueden ser, pero están limitadas a, una toxina o fragmento de toxina recombinantes purificados que comprenden al menos un dominio de toxina citotóxico funcional, por ejemplo, seleccionado entre al menos la ricina, la toxina diftérica, una toxina de veneno, o una toxina bacteriana. El término toxina también incluye tanto las endotoxinas como las exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus mutante recombinante, de origen natural que pueda causar cualquiera afcción patológica en seres humanos y otros mamíferos, incluyendo el choque por toxinas, que puede ocasionar la muerte. Tales toxinas pueden incluir, pero no está limitada a, la enterotoxina termolábil (LT) enterotoxigénica de *E. coli*, la enterotoxina termoestable (ST), la citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, el síndrome del choque tóxico de la toxina-1 (TSST-1), la enterotoxina A estafilocócica (SEA), B (SEB), o C (SEC), enterotoxinas estreptocócicas y similares. Tales bacterias incluyen, pero no están limitadas a, las cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (por ejemplo, las cepas del serotipo O157:H7), especies de *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Camphlobacter* (por ejemplo, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), especies de *Helicobacter*, (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, especies de *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptococos*. Véase, por ejemplo, Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3ª ed., págs. 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans *et al.*, eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2ª. Ed., págs 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell *et al*, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3ª Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow *et al*, eds., *The Merck Manual*, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood *et al*, *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack *et al*, *Science*; 248:705-711 (1990).

Los compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpo anti-integrina dual de la presente invención pueden comprender adicionalmente al menos uno de cualquiera de los siguientes agentes auxiliares útiles, tales como, pero no limitados a, diluyentes, aglutinantes, estabilizadores, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, coadyuvantes o similares. Se prefieren los agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitantes de, y los métodos de preparación de tales soluciones estériles son bien conocidos en la técnica, tales como, pero no limitados a, Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Se pueden seleccionar rutinariamente portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la forma de administración, la solubilidad y/o la estabilidad de la composición de anticuerpo o fragmento anti-integrina dual como es conocido en la técnica o como se describe en la presente memoria.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen pero no están limitados a proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra-, y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes por separado o combinados, que comprenden solos o combinados 1-99,99% en peso o volumen. Los excipientes proteicos ilustrativos incluyen albúmina de sueros tales como la albúmina de suero humana (HSA), la albúmina humana recombinante (rHA), la gelatina, la caseína, y similares. Los componentes de aminoácido/anticuerpos representativos, que también pueden funcionar con capacidad tamponadora, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Un aminoácido preferido es la glicina.

Los excipientes carbohidratados adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, como el manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes carbohidratados preferidos para su uso en la presente invención son el manitol, la trehalosa y la rafinosa.

Las composiciones de anticuerpo anti-integrina dual también pueden incluir un tampón o un agente para el ajuste del pH; típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánicos. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, hidrocloreuro de trometamina, o tampones de fosfato. Los tampones preferidos para su uso en las presentes composiciones son las sales de ácidos orgánicos tales como los citratos.

Adicionalmente, las composiciones de anticuerpo anti-integrina dual de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclo-dextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adicionales para su uso en las composiciones de anticuerpos o porciones anti-integrina dual de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, los enumerados en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19^a ed., Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52^a ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales portadores o excipientes preferidos son los carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

40 *Formulaciones*

Como ha señalado anteriormente, la invención proporciona una formulación estable, que es preferiblemente un tampón fosfato con una solución salina o una sal elegida, así como soluciones y formulaciones conservadas que contienen un conservante, así como formulaciones conservada de usos múltiples adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un anticuerpo anti-integrina dual en una formulación farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones conservadas contienen al menos un conservante conocido o se seleccionan opcionalmente del grupo consistente en al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercurio, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Se puede utilizar cualquier concentración adecuada o una mezcla como es conocido en la técnica, tal como 0,001-5%, o cualquier intervalo o valor en el mismo, tal como, pero no limitado a 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Los ejemplos no limitantes incluyen, sin conservante, m-cresol de 0,1-2% (por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), alcohol bencílico de 0,1-3% (por ejemplo, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), timerosal de 0,001-0,5% (por ejemplo, 0,005, 0,01), fenol de 0,001-2,0% (por ejemplo, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), alquilparabeno o alquilparabenos de 0,0005-1,0% (por ejemplo, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%), y similares.

Como se ha señalado anteriormente, la invención proporciona un artículo de manufactura, que comprende material de embalaje y al menos un vial que comprende una solución de al menos un anticuerpo anti-integrina dual con los tampones y/o conservantes prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, donde dicho material de embalaje comprende una etiqueta que indica que la solución puede ser mantenida a lo largo de un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más. La invención comprende adicionalmente un artículo de manufactura, que comprende material de embalaje, un primer vial que comprende liofilizado al menos un anticuerpo anti-integrina dual, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso del tampón o conservante prescrito, donde

ES 2 346 041 T3

dicho material de embalaje comprende una etiqueta que instruye al paciente en la reconstitución de al menos un anticuerpo anti-integrina dual en el diluyente acuoso para formar una solución que se puede mantener a lo largo de un período de veinticuatro horas o más.

5 El al menos un anticuerpo anti-integrina dual utilizado de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante métodos recombinantes, incluyendo a partir de células de mamífero o preparaciones transgénicas, o se puede purificar a partir de otras fuentes biológicas, como se describe en la presente memoria o como se conoce en la técnica.

10 El rango de al menos un anticuerpo anti-integrina dual en el producto de la presente invención incluye las cantidades producidas tras la reconstitución, si es en un sistema húmedo/seco, concentraciones de aproximadamente 1,0 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 1.000 mg/ml , aunque serán operativas concentraciones inferiores y superiores y dependen del vehículo de liberación deseado, por ejemplo, las formulaciones en solución diferirán entre los métodos con parches transdérmicos, pulmonares, transmucosales u osmóticos o con microbomba.

15 Preferiblemente, el diluyente acuoso opcionalmente comprende adicionalmente un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabenos (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservante utilizada en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto antimicrobiano. Tales
20 concentraciones dependen del conservante seleccionado y son fácilmente determinadas por el experto en la técnica.

Opcionalmente y preferiblemente se pueden añadir al diluyente otros excipientes, por ejemplo, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, conservantes, potenciadores. Un agente isotónico, tal como la glicerina, se utiliza comúnmente a concentraciones conocidas. Preferiblemente se añade un tampón tolerado fisiológicamente para proporcionar
25 un mejor control del pH. Las formulaciones pueden abarcar un amplio intervalo de pH, tal como un pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 10, y preferiblemente oscila de un pH de aproximadamente 5 a un pH de aproximadamente 9, y un intervalo mas preferido aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. Preferiblemente las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,8. Los tampones preferidos incluyen tampones de fosfato, muy preferiblemente fosfato de sodio, particularmente solución salina
30 tamponada con fosfato (PBS).

Otros aditivos, tales como solubilizadores farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)sorbitán), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)sorbitán), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno), y PEG (polietilenglicol) o
35 tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 o 80 o poloxámero 184 o 188, polioles Pluronic®, otros copolímeros de bloques, y quelantes tales como el EDTA y EGTA se pueden añadir opcionalmente a las formulaciones o composiciones para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se utiliza una bomba o un contenedor de plástico para administrar la formulación. La presencia de tensioactivo farmacéuticamente aceptable mitiga la tendencia de la proteína a agregarse.

40 Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-integrina dual y un conservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabenos, (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos en un
45 diluyente acuoso. La mezcla de el al menos un anticuerpo anti-integrina dual y el conservante en un diluyente acuoso se lleva a cabo utilizando procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo anti-integrina dual en una solución tamponada con el conservante deseado en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante a las concentraciones deseadas. Un experto normal en la técnica podría reconocer variaciones de este procedimiento. Por
50 ejemplo, el orden en el que añaden los componentes, el que se utilicen aditivos adicionales, la temperatura y el pH al que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y los medios de administración utilizados.

55 Las formulaciones reivindicadas se pueden ofrecer a los pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial de producto liofilizado de al menos un anticuerpo anti-integrina dual que se reconstituye con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente un tampón fosfato y/o solución salina y una sal elegida, en un diluyente acuoso. El vial de una sola solución o el vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y pueden ser suficiente para un ciclo simple o múltiple de tratamiento de los pacientes, y pueden proporcionar así un régimen de tratamiento más conveniente que los disponibles en
60 la actualidad.

Los presentes artículos de manufactura reivindicados son útiles para su administración en un plazo desde inmediatamente a veinticuatro horas o más. Por consiguiente, los artículos de manufactura reivindicados en la actualidad ofrecen ventajas significativas para el paciente. Las formulaciones de la invención, opcionalmente se puede almacenar
65 a temperaturas de aproximadamente 2 a aproximadamente 40°C y mantener la actividad biológica de la proteína durante períodos de tiempo prolongados, permitiendo así una etiqueta en el envase que indica que la solución se puede mantener y/o utilizar durante un período de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, o 96 horas o más. Si se utiliza un diluyente conservado, tal etiqueta puede incluir el uso hasta 1-12 meses, medio, uno y medio, y/o dos años.

ES 2 346 041 T3

Las soluciones de al menos un anticuerpo anti-integrina dual en la invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende mezclar al menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La mezcla se realiza utilizando procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar un disolvente adecuado, por ejemplo, una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón se combina en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y opcionalmente un conservante o tampón a las concentraciones deseadas. Un experto normal en la técnica podría advertir variaciones de este procedimiento. Por ejemplo, el orden al que se añaden los componentes, el que se utilicen aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y los métodos de administración utilizados.

Los productos reivindicados se pueden ofrecer a los pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial de producto liofilizado de al menos un anticuerpo anti-integrina dual que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. El vial de una sola solución o el vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y pueden ser suficiente para un ciclo simple o múltiple de tratamiento de los pacientes, y proporcionan así un régimen de tratamiento más conveniente que los disponibles en la actualidad.

Los productos reivindicados pueden ser proporcionados indirectamente a los pacientes proporcionando a las farmacias, clínicas, u otras de tales instituciones e instalaciones, las soluciones transparentes o los viales duales que incluyen un vial de producto liofilizado de al menos un anticuerpo anti-integrina dual que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. La solución transparente en este caso puede ser de hasta un litro o incluso de tamaño más grande, proporcionando una gran reserva de la que pueden ser recuperadas porciones más pequeñas de la al menos una solución de anticuerpo una o varias veces para su transferencia a viales más pequeños y proporcionadas por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Los dispositivos reconocidos que componen estos sistemas de un solo vial incluyen los dispositivos inyector de tipo bolígrafo para la liberación de una solución como BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen®, and OptiPen®, GenotropinPen®, GenotroNorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, por ejemplo, fabricados o desarrollados por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de viales duales incluyen los sistemas inyector de tipo bolígrafo para reconstituir un fármaco liofilizado en un cartucho para la liberación de la solución reconstituida tal como HumatroPen®.

Los productos reivindicados en la actualidad incluyen material de embalaje. El material de embalaje proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las que se puede utilizar el producto. El material de embalaje de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para reconstituir el al menos un anticuerpo anti-integrina dual en el diluyente acuoso para formar una solución y utilizar la solución en un plazo de 2-24 horas o superior para el producto de dos viales húmedo/seco. Para el producto de solución en un solo vial, la etiqueta indica que esa solución se puede utilizar durante un periodo de 2-24 horas o más. Los productos reivindicados actualmente son útiles para uso de productos farmacéuticos humanos.

Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-integrina dual y un tampón seleccionado, preferiblemente un tampón de fosfato que contiene solución salina o una sal elegida. La mezcla de el al menos un anticuerpo y el tampón en un diluyente acuoso se lleva a cabo mediante procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón con el agente tamponador deseado en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el tampón a las concentraciones deseadas. Un experto normal en la técnica podría reconocer variaciones de este procedimiento. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, el que se utilicen aditivos adicionales, la temperatura y el pH al que prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y los medios de administración utilizados.

Las formulaciones estables o conservadas reivindicadas se pueden ofrecer a los pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial de producto liofilizado de al menos un anticuerpo anti-integrina dual que es reconstituido con un segundo vial que contiene un conservante o tampón y excipientes en un diluyente acuoso. El vial de una sola solución o el vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y pueden ser suficiente para un ciclo simple o múltiple de tratamiento de los pacientes, y proporcionan así un régimen de tratamiento más conveniente que los disponibles en la actualidad.

Al menos un anticuerpo anti-integrina dual en las formulaciones o soluciones estables descritas en la presente memoria, se pueden administrar a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una variedad de métodos de liberación incluyendo la inyección SC o IM; métodos transdérmicos, pulmonares, transmucosales, de implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba, o por otros medios apreciados por el experto en la técnica, como es bien conocido en la técnica.

Aplicaciones Terapéuticas

5 El anticuerpo o la composición de la invención pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con integrinas duales, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, como se conoce en la técnica o como se describe en la presente memoria.

10 La enfermedad relacionada con la integrina dual puede ser al menos una entre la obesidad, una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad maligna o una enfermedad neurológica.

10 El anticuerpo o la composición de la invención pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, incluyendo pero no limitada a, al menos una entre artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis
 15 ulcerosa, lupus eritematoso generalizado, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/Granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, procedimientos de orquitis/reversión de la vasectomía, enfermedades alérgicas y atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis de contacto alérgica, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis gram positiva, sepsis gram negativa, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococemia, trauma y hemorragia, quemaduras, exposición a la radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de fatiga respiratoria del adulto, artritis reumatoide, hepatitis inducida por el alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia de células falciformes, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones de hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis
 25 sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, episodios de rechazo de cualquier órgano o tejido, rechazo del trasplante de riñón, rechazo del trasplante de corazón, rechazo del trasplante de hígado, rechazo del trasplante de páncreas, rechazo del trasplante de pulmón, rechazo del trasplante de médula ósea (TMO), rechazo de aloinjertos de piel, rechazo de trasplante de cartílago, rechazo del injerto de hueso, rechazo del trasplante de intestino delgado, rechazo del implante de timo fetal, rechazo del trasplante de paratiroides, rechazo xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjertos, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes de tipo B resistente a la insulina, asma, miastenia gravis, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso generalizado, el síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, y síndrome de cambios en la piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, síndrome de cambios en la piel, síndrome antifosfolípido, pénfigo, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad idiopática de Addison, diabetes mellitus, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, vitíligo, vasculitis, síndrome post-cardiotomía MI, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjertos, granulomas debidos a microorganismos intracelulares, sensibilidad a los fármacos, enfermedad de Wilson metabólica/idiopática, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica del recién nacido, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), linfocitosis hematofagocítica familiar, problemas dermatológicos, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, glomerulonefritis, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, terapia con okt3, terapia anti-cd3, terapia con citoquinas, quimioterapia, por ejemplo, radioterapia (incluyendo pero no limitada a astenia, anemia, caquexia, etc), intoxicación por salicilato crónica, y similares. Véanse, por ejemplo, Merck Manual, Ediciones 12^a-17^a, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, eds., Segunda Edición, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

50 El anticuerpo o su composición pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente, incluyendo pero no limitada a, al menos una entre síndrome de aturdimiento miocárdico, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, derrame cerebral, derrame cerebral isquémico, hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad arteriosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, choque, sfilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos ectópicos atriales, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome post-perfusión, respuesta inflamatoria al bypass cardiopulmonar, taquicardia caótica o multifocal auricular, taquicardia regular de QRS estrecho, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz de His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo del haz ramificado, trastornos isquémicos del miocardio, enfermedad arterial coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, miocardiopatía, miocardiopatía dilatada congestiva, miocardiopatía restrictiva, enfermedades valvulares del corazón, endocarditis, enfermedades del pericardio, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad ateriosclerótica periférica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, varices, fistulas arteriovenosas, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome post-bombeo, lesión por isquemia-reperfusión, y
 65 similares. Tal método puede comprender opcionalmente la administración de una cantidad eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-integrina dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia.

El anticuerpo o su composición pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero no limitada a, al menos una entre: una infección bacteriana aguda o crónica, procedimientos parasitarios o infecciosos agudos y crónicas, incluyendo infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, infección por VIH/neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (A, B o C, o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, *E. coli* 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénico trombótico, malaria, fiebre hemorrágica del dengue, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium intracelular, neumonía por Pneumocystis carinii, enfermedad pélvica inflamatoria, orquitis/epididimitis, legionella, enfermedad de Lyme, virus de Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico vital asociado, encefalitis vital/meningitis aséptica, y similares.

El anticuerpo o su composición pueden ser para modular o tratar al menos una enfermedad maligna de una célula, tejido, órgano, animal o el paciente, incluyendo pero no limitada a, al menos una entre: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA de células B, células T o FAB, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor óseo relacionado con el cáncer, etc.

El anticuerpo o su composición pueden ser para modular o tratar al menos a una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero no limitada a, al menos una entre: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza por migraña, complejo SIDA-demencia, enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple y la mielitis transversa aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelosos tales como las lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos hipercinéticos del movimiento como el corea de Huntington y el corea senil; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por los fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos hipocinéticos del movimiento, tales como la enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelosas, tales como la ataxia espinal, la ataxia de Friedreich, degeneraciones cerebelosas corticales, atrofia sistémica múltiple (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, y trastorno mitocondrial multisistémico); trastornos desmielinizantes centrales, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversal aguda; y trastornos de la unidad motora tales como las atrofas neurogénicas musculares (degeneración de las células del asta anterior, tal como la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal infantil y la atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down en la mediana edad; Enfermedad difusa con cuerpos de Lewy; demencia senil de tipo cuerpo de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz, y demencia pugilística, y similares. Tal método puede comprender opcionalmente la administración de una cantidad eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo o porción especificada o variante contra TNF a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite la modulación, el tratamiento o la terapia. Véase, por ejemplo, Merck Manual, 16ª Edición, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

Cualquiera de estos métodos puede comprender la administración de una cantidad eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-integrina dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia. Tal método puede comprender opcionalmente adicionalmente una terapia de administración simultánea o combinada para el tratamiento de tales enfermedades inmunitarias, donde la administración de dicho al menos un anticuerpo anti-integrina dual, porción específica o variante del mismo, comprende adicionalmente la administración, antes, de forma simultánea y/o después, de al menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o un fragmento para TNF, un receptor o fragmento para TNF soluble, proteínas de fusión del mismo, o un antagonista de molécula pequeña del TNF), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un medicamento no esteroideo anti-inflamatorio (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenemo, una cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabolizante, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un agente nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusígeno, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una vacuna, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un medicamento de reemplazo hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de la mitosis, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una efedrina o análogo, alfa dornasa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquinas. las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2ª Edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Los antagonistas de TNF adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-TNF, sus fragmentos de unión al antígeno, y moléculas receptoras que se unen específicamente al TNF; compuestos que impiden y/o inhiben la síntesis de TNF, la liberación de TNF o su acción sobre las células diana, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas de los receptores de adenosina A2b y potenciadores del receptor de adenosina A2b; compuestos que impiden y/o inhiben la señalización del receptor de TNF, tales como los inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la escisión del TNF de membrana, tales como los inhibidores de metaloproteinasas; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad del TNF, tales como la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril), y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o las síntesis de TNF, como los inhibidores de la quinasa MAP.

Según se utiliza en la presente memoria, un “anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral”, “anticuerpo contra TNF”, “anticuerpo contra TNF α ”, o fragmento y similares disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere la actividad del TNF α *in vitro*, *in situ* y/o, preferiblemente, *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo contra TNF humano adecuado de la presente invención se puede unir a TNF α e incluye anticuerpos anti-TNF, sus fragmentos de unión al antígeno del mismo, y sus mutantes o dominios especificados que se unen específicamente al TNF α . Un anticuerpo o fragmento contra TNF adecuados también pueden disminuir, bloquear, anular, interferir, impedir o inhibir la síntesis ARN, ADN o proteínas del TNF, la liberación del TNF, la señalización del receptor de TNF, la escisión del TNF de membrana, la actividad del TNF, la producción y/o síntesis de TNF.

El anticuerpo quimérico cA2 consiste en la región variable de unión al antígeno del anticuerpo IgG1 de ratón anti-TNF α humano neutralizador de alta afinidad, denominado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa, IgG1 humana. La región Fc de IgG1 humana mejora la función efectora del anticuerpo alogénico, aumenta la vida media en suero circulante y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y especificidad epitópica del anticuerpo quimérico cA2 se deriva de la región variable del anticuerpo murino A2. En una realización concreta, una fuente preferida para los ácidos nucleicos que codifican la región variable del anticuerpo murino A2 es la línea celular de hibridoma A2.

El A2 quimérico (cA2) neutraliza el efecto citotóxico tanto del TNF humano natural como del TNF α recombinante de una manera dependiente de la dosis. A partir de los ensayos de unión del anticuerpo quimérico cA2 y el TNF α humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad de los anticuerpos quiméricos cA2 era de $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Los métodos preferidos para la determinación de la especificidad y la afinidad del anticuerpo monoclonal mediante inhibición competitiva se puede encontrar en Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor *et al.*, *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); and Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983).

En una realización concreta, el anticuerpo monoclonal murino A2 es producido por una línea celular denominada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 es producido por una línea celular denominada c168A.

Los ejemplos adicionales de los anticuerpos monoclonales anti-TNF que se pueden utilizar en la presente invención se describen en la técnica (véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.231.024; Möller, A. *et al.*, *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); Solicitud de los Estados Unidos Núm. 07/943.852 (presentada el 11 de Septiembre de 1992); Rathjen *et al.* *Publicación Internacional* Núm. 91/02078 (publicada el 21 de Febrero 1991); Rubin *et al.*, *Publicación de Patente EPO* Núm. 0 218 868 (publicada el 22 de Abril de 1987); Yone *et al.*, *Publicación de Patentes EPO* Núm. 0 288 088 (26 de Octubre de 1988); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager, *et al.* *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly *et al.* *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, *et al.* *Hybridoma* 6:489-507 (1987), y Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987).

Moléculas Receptoras de TNF

Las moléculas receptoras de TNF preferidas útiles en la presente invención son aquellas que se unen al TNF α con alta afinidad (véanse, por ejemplo, Feldmann *et al.* *Publicación Internacional* Núm. WO 92/07076 (publicada el 30 de Abril de 1992); Schall *et al.*, *Cell* 61:361-370 (1990), y Loetscher *et al.*, *Cell* 61:351-359 (1990) y poseen opcionalmente baja inmunogenicidad. En particular, los receptores de superficie celular de TNF de 55 kDa (p55 TNF-R) y 75 kDa (p75 TNF-R) son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (DEC) de los receptores o sus porciones funcionales (véase, por ejemplo, Corcoran *et al.* *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), también son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de los receptores de TNF, que comprenden DEC, se han detectado en la orina y el suero en forma de proteínas de unión inhibitoras de TNF α de 30 kDa y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Las moléculas multiméricas receptoras de TNF y las moléculas de fusión con el inmunoreceptor de TNF, y sus derivados y fragmentos o porciones, son ejemplos adicionales de las moléculas receptoras de TNF que se pueden utilizar en los métodos y las composiciones de la presente invención. Las moléculas receptoras de TNF que se pueden utilizar en la invención se caracterizan por su capacidad para tratar a los pacientes durante períodos prolongados con un alivio de los síntomas de bueno a excelente y baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos alcanzados.

ES 2 346 041 T3

Las moléculas multiméricas receptoras de TNF útiles en la presente invención comprenden la totalidad o una parte funcional del DEC de dos o más receptores de TNF conectados a través de uno o más conectores polipeptídicos u otros conectores no peptídicos, tales como el polietilenglicol (PEG). Las moléculas multiméricas puede comprender adicionalmente un péptido señal de una proteína secretada para la expresión directa de la molécula multimérica. Estas moléculas multiméricas y los métodos para su producción se han descrito en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 08/437.533 (presentada el 09 de Mayo de 1995).

Las moléculas de fusión con el inmunoreceptor de TNF útiles en la presente invención comprenden al menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina y toda o una porción funcional de uno o más receptores de TNF. Estas moléculas de fusión con el inmunoreceptor se pueden ensamblar como monómeros, o hetero- u homomultímeros. Las moléculas de fusión con el inmunoreceptor también pueden ser monovalentes o multivalentes. Un ejemplo de tal molécula de fusión con el inmunoreceptor de TNF es la proteína de fusión receptora de TNF/IgG. Las moléculas de fusión con el inmunoreceptor de TNF y los métodos para su producción han sido descritos en la técnica (Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med 174:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler *et al.*, Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.447.851; y Solicitud de los Estados Unidos Núm. 08/442.133 (presentada el 16 de Mayo de 1995)). Los métodos para la producción de moléculas de fusión con el inmunoreceptor también se pueden encontrar en Capon *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.116.964; Capon *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.538, y Capon *et al.* Nature 337:525-531 (1989).

Un equivalente funcional, derivado, fragmento o región de la molécula receptora de TNF hace referencia a la porción de la molécula receptora de TNF, o la porción de la secuencia de moléculas receptoras de TNF que codifican la molécula receptora de TNF, que tienen suficiente tamaño y secuencias que se parecen funcionalmente a moléculas receptoras de TNF que pueden ser utilizadas en la presente invención (por ejemplo, se unen a TNF α con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional de una molécula receptora de TNF también incluye moléculas receptoras de TNF modificadas que se parecen funcionalmente a las moléculas receptoras de TNF que se pueden utilizar en la presente invención (por ejemplo, se unen a TNF α con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Por ejemplo, un equivalente funcional de la molécula receptora de TNF puede contener un codón "silencioso" o una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos (por ejemplo, sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o la sustitución de un codón que codifica el mismo o diferente aminoácido hidrófobo por otro codón que codifica un aminoácido hidrófobo). Ver Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000).

Las citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Véase, por ejemplo, CopewithCytokines.com. Los antagonistas de citoquinas incluyen, pero no están limitados a, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier receptor, fragmento o mimético soluble, cualquier antagonista de molécula pequeña, o cualquiera de sus combinaciones.

Tratamientos terapéuticos. El anticuerpo o la composición de la invención se pueden utilizar en un método para tratar un trastorno mediado por la integrina dual, que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o la composición anti-integrina dual a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que lo necesite. Tal método opcionalmente puede comprender adicionalmente la administración simultánea o la terapia combinada para el tratamiento de tales enfermedades inmunitarias, donde la administración de dicho anticuerpo o porción especificada del mismo, o composición comprende adicionalmente la administración, antes, de forma simultánea, y/o después, de al menos uno seleccionado entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o fragmento contra TNF, un receptor o fragmento soluble de TNF, sus proteínas de fusión, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenemo, cefalosporina, una fluoroquinolona; un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico; un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un agente nutrición, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusígeno, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una vacuna, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un medicamento de reemplazo hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de la mitosis, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromoglicato, una adrenalina o analógico, alfa dornasa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquinas.

Típicamente, el tratamiento de afecciones patológicas se efectúa mediante la administración de una cantidad o dosis eficaz de al menos una composición de anticuerpo anti-integrina dual que suman, de promedio, un intervalo de al menos aproximadamente 0,01 a 500 miligramos de al menos un anticuerpo anti-integrina dual por kilogramo de paciente por dosis, y preferiblemente de al menos 0,1 a 100 miligramos de anticuerpos/kilogramo de paciente por ad-

ES 2 346 041 T3

ministración única o múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. Alternativamente, la concentración en suero eficaz puede comprender una concentración en suero de 0,1-5.000 $\mu\text{g/ml}$ por administración única o múltiple. Las dosis adecuadas son conocidas por los profesionales médicos y, por supuesto, dependerán del estado de enfermedad concreto, la actividad específica de la composición que esté siendo administrada, y el paciente concreto que experimente tratamiento. En algunos casos, para lograr la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario establecer una administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis controlada o medida concreta, donde las administraciones individuales se repiten hasta que se alcanzan la dosis diaria o el efecto deseados.

Las dosis preferidas pueden incluir opcionalmente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción, o para lograr una concentración en suero de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 14,9, 15,0, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 y/o 5000 $\mu\text{g/ml}$ de concentración en suero por administración única o múltiple, o cualquiera de sus intervalos, valores o fracciones.

Alternativamente, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; la edad, la salud, y el peso del receptor; la naturaleza y el grado de los síntomas, el tipo de tratamiento simultáneo, la frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado. Usualmente una dosis de ingrediente activo puede ser de 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Por lo general es eficaz de 0,1 a 50, y preferiblemente de 0,1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en forma de liberación sostenida para obtener los resultados deseados.

A modo de ejemplo no limitante, el tratamiento de seres humanos o animales puede proporcionarse en forma de una dosificación única o periódica de al menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 a 100 mg/kg, por ejemplo 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, durante al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o, alternativamente o adicionalmente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, ó 52, o, alternativamente o adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 años, o cualquiera de sus combinaciones, utilizando infusión única o dosis repetidas.

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna contienen generalmente de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o contenedor. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará presente por lo común en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 99,999%, en peso, basándose en el peso total de la composición.

Para la administración parenteral, el anticuerpo puede ser formulado como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado proporcionados asociados, o por separado, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son: agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 1-10%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados. El vehículo o polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia modelo en este campo.

Administración Alternativa

De acuerdo con la presente invención se pueden utilizar muchos modos conocidos y desarrollados para la administración de cantidades farmacéuticamente eficaces de al menos un anticuerpo anti-integrina dual de acuerdo con la presente invención. Si bien se utiliza la administración pulmonar en la siguiente descripción, se pueden utilizar otros modos de administración según la presente invención con resultados adecuados.

Los anticuerpos contra la integrina dual de la presente invención se pueden entregar en un portador, como una solución, emulsión, coloide, o suspensión, o como un polvo seco, utilizando cualquiera de una variedad de dispositivos y métodos adecuados para la administración mediante inhalación u otros modos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

Formulación y Administración Parenteral

Las formulaciones para la administración parenteral puede contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las suspensiones acuosas u oleosas para inyectables se pueden preparar utilizando un emulsionante o humidificador adecuado y un agente suspensor, de acuerdo con los métodos ya conocidos. Los agentes para inyectables pueden ser un agente diluyente administrable no oralmente, no tóxico tal como una solución acuosa o una solución o suspensión inyectable estéril en un solvente. En cuanto al vehículo o disolvente utilizables se permiten, agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como disolvente corriente, o disolvente suspensor, se puede utilizar un aceite no volátil estéril. Para estos propósitos, se puede utilizar cualquier clase de aceite y ácidos grasos no volátiles, incluyendo los aceites grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono- o di- o triglicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. Las administración parenteral es conocida en la técnica e incluye, pero no está limitada a, medios convencionales de inyección, un dispositivo de inyección sin aguja con gas a presión como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.851.198, y un dispositivo perforador láser como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.839.446.

Liberación Alternativa

La invención se refiere adicionalmente a la administración de al menos un anticuerpo anti-integrina dual por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria intracelular, intracelebrar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrico, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica. Se puede preparar al menos una composición de anticuerpo anti-integrina dual para su uso por vía parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otra administración particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para su uso en la administración vaginal o rectal particularmente en las formas semisólidas, tales como, pero no limitadas a, cremas y supositorios; para la administración bucal, o sublingual, tal como, pero no limitadas a, en forma de comprimidos o cápsulas, o intranasalmente tal como, pero no limitadas a, la forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o transdérmicamente tal como no limitadas a un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de liberación mediante parche con potenciadores químicos, tales como dimetilsulfóxido para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración de fármaco en el parche transdérmico (Junginger, *et al.* En "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., págs. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de las formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (documento WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear vías de transporte transitorias tales como la electroporación, o para aumentar la movilidad de los fármacos cargados a través de la piel tales como la iontoforesis, o la aplicación de ultrasonidos tales como la sonoforesis (Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.309.989 y 4.767.402).

Administración Pulmonar/Nasal

Para la administración pulmonar, preferiblemente se libera al menos una composición de anticuerpo anti-integrina dual a un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias inferiores de los pulmones o los senos. De acuerdo con la invención, se puede liberar al menos un anticuerpo anti-integrina dual mediante cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación o nasales conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico mediante inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar las formulaciones en aerosol en la cavidad sinusal o los alvéolos de un paciente incluyen los inhaladores de dosis medidas, los dosificadores, los nebulizadores, los generadores de polvo seco, los pulverizadores, y similares. Otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos también son conocidos en la técnica. En todos estos dispositivos se puede hacer uso de las formulaciones adecuadas para la administración para dispensar el anticuerpo en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar compuestos de cualquiera de las soluciones (acuosas y no acuosas) o partículas sólidas. Los inhaladores de dosis medidas tales como el inhalador de dosis medida Ventolin[®], suelen utilizar un gas propelente y requieren accionamiento durante la inspiración (Véanse, por ejemplo, el documento WO 94/16970, el documento WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler[®] (Astra), Rotahaler[®] (Glaxo), Diskus[®] (Glaxo), el inhalador Spiros[®] (Dura), los dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador de polvo Spinhaler[®] (Fisons), utilizan el accionamiento mediante respiración de un polvo mezclado (documento US 4668218 Astra, documento EP 237507 Astra, documento WO 97/25086 Glaxo, documento WO 94/08552 Dura, documento US 5458135 Inhale, documento WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como AERx[™] Aradigm, el nebulizador Ultravent[®] (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II[®] (Marquest Medical Products) (documento US 5404871 Aradigm, documento WO 97/22376), incorporadas las referencias anteriores en su totalidad a la presente memoria como referencia, producen aerosoles a partir de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medidas, los inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de partículas pequeñas. Estos ejemplos específicos de los dispositivos de inhalación comercialmente disponibles están destinados a ser un representante de los dispositivos específicos para la práctica de esta invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Preferiblemente, se libera una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-integrina dual mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay varias características deseables de un dispositivo de inhalación para la administración de al menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la liberación mediante el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible y exacta. El

dispositivo de inhalación, opcionalmente, puede liberar pequeñas partículas secas, por ejemplo, menores de 10 μm , preferiblemente de aproximadamente 1-5 μm , para una buena respirabilidad.

5 *Administración de Composiciones contra integrina dual en forma de Pulverización*

Una pulverización que incluye la proteína de la composición contra la integrina dual puede ser producida impediendo una suspensión o solución de al menos un anticuerpo anti-integrina dual a través de una boquilla a presión. El tamaño de la boquilla y la configuración, la presión aplicada, y la velocidad de introducción del líquido se pueden elegir para lograr el rendimiento y el tamaño de partícula deseado. Una electropulverización se puede producir, por ejemplo, mediante un campo eléctrico conectado a una alimentación capilar o mediante boquilla. Ventajosamente, las partículas de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-integrina dual liberadas por un pulverizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente de 5 μm , y muy preferiblemente de aproximadamente 2 μm , a aproximadamente 3 μm .

Las formulaciones de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-integrina dual adecuadas para su uso con un pulverizador incluyen típicamente proteínas de composiciones de anticuerpos en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-integrina dual por ml de solución o en mg/g, o cualquier intervalo o valor en el mismo, por ejemplo, pero no limitado a, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml o mg/g. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente isotónico, un conservante, un tensioactivo, y, preferiblemente, cinc. La formulación puede también incluir un excipiente o agente para la estabilización de la proteína de la composición de anticuerpos, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína en masa, o un carbohidrato. Las proteínas en masa útiles en la formulación de proteínas de las composiciones de anticuerpos incluyen albúmina, protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en la formulación de proteínas de la composición de anticuerpos incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de proteína de la composición de anticuerpos también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o evitar la agregación inducida por la superficie de la proteína de la composición de anticuerpos causada por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear diversos tensioactivos convencionales, tales como ésteres y alcoholes de ácidos grasos de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol. Las cantidades oscilarán generalmente entre 0,001 y 14% en peso de la formulación. Especialmente los tensioactivos preferidos para los fines de la presente invención son monooleato de polioxietilensorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También se pueden incluir en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tales como los anticuerpos contra integrinas duales, o porciones especificadas o variantes.

Administración de composiciones de anticuerpo contra integrina dual mediante un Nebulizador

Las proteínas de las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante un nebulizador, tal como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Normalmente, en un nebulizador de chorro, se utiliza una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire de alta velocidad a través de un orificio. A medida que el gas se expande fuera de la boquilla, se crea una región de baja presión, que retira una solución de proteínas de la composición de anticuerpos a través de un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. El flujo de líquido desde el tubo capilar se corta en forma de filamentos inestables y gotitas a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Se pueden emplear una gama de configuraciones, velocidades de flujo, y tipos de deflexión para obtener las características de rendimiento deseadas de un nebulizador de chorro dado. En un nebulizador ultrasónico, se utiliza energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía vibracional, mecánica, empleando típicamente un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de proteínas de la composición de anticuerpos ya sea directamente o a través de un fluido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la proteína de la composición de anticuerpos. Ventajosamente, las partículas de proteína de la composición de anticuerpos liberadas mediante un nebulizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , y muy preferiblemente de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm .

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-integrina dual adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, incluyen típicamente una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína de anticuerpo anti-integrina dual por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente isotónico, un conservante, un tensioactivo, y, preferiblemente, cinc. La formulación puede también incluir un excipiente o agente para la estabilización de la al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-integrina dual, tal como tampón, un agente reductor, una proteína en masa, o un carbohidrato. Las proteínas en masa útiles en la formulación de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-integrina dual son la albúmina, la protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en la formulación de al menos un anticuerpo anti-integrina dual incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La al menos una formulación de anticuerpo anti-integrina dual también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o evitar la agregación inducida por la superficie de el al menos un anticuerpo anti-integrina dual causada por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear varios tensioactivos convencionales, tales como ésteres y alcoholes de ácidos grasos de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán. Las cantidades por lo general oscilarán entre 0,001 y 4% en peso de la formulación. Los tensioactivos especialmente

ES 2 346 041 T3

preferidos para los fines de esta invención son monooleato polioxietilensorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También pueden incluirse en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como la proteína del anticuerpo.

5 *Administración de Composiciones de anticuerpos contra integrina dual Mediante un Inhalador de Dosis Medida*

En un inhalador de dosis medida (IDM), un propelente, al menos un anticuerpo anti-integrina dual, y cualquier excipiente u otros aditivos están contenidos en un recipiente en forma de una mezcla que incluye un gas comprimido
10 licuado. El accionamiento de la válvula reguladora libera la mezcla en forma de aerosol, que contiene preferiblemente partículas en el rango de tamaño de menos de aproximadamente 10 μm , preferiblemente de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , y muy preferiblemente de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm . El tamaño deseado de partículas de aerosol se puede obtener mediante el empleo de una formulación de proteínas de la composición de anticuerpos producida mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo molienda de
15 chorro, secado por aspersión, condensación de punto crítico, o similares. Los inhaladores de dosis medida preferidos son los fabricados por 3M o Glaxo y emplean un propelente hidrofluorocarbonado.

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-integrina dual para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida incluirán generalmente un polvo finamente dividido que contiene al menos un anticuerpo anti-integrina dual en forma de una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier sustancia convencional empleada para este fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2 tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano 134a-), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similares. Preferiblemente, el propelente es un hidrofluorocarbono. El tensioactivo se
25 puede elegir para estabilizar el al menos un anticuerpo anti-integrina dual en forma de una suspensión en el propelente, para proteger el agente activo de la degradación química, y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán, lecitina de soja, ácido oleico, o similares. En algunos casos se prefieren los aerosoles en solución que utilizan disolventes tales como el etanol. También pueden estar incluidos en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como la proteína.

Un experto normal en la técnica reconocerá que los métodos de la presente invención se pueden lograr mediante la administración pulmonar de al menos una composición de anticuerpo anti-integrina dual a través de dispositivos no descritos en la presente memoria.

35 *Formulación y Administración Oral*

Las formulaciones para la administración oral dependen de la administración conjunta de coadyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensioactivos no iónicos tales como polioxietilenoileéter y n-hexadecilpolietilenoéter) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la administración conjunta de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. El compuesto componente activo de la forma de dosificación de tipo sólido para la administración oral se puede mezclar con al menos un aditivo, incluyendo sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semisintéticos y glicéridos. Estas formas de dosificación también pueden contener otros tipos de aditivos, por ejemplo, agentes diluyentes inactivos, lubricantes tales como estearato de magnesio, parabenos, agentes conservantes tales como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidantes tales como cisteína, disgregantes, aglutinantes, espesantes, agentes tamponadores, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, etc.

Los comprimidos y las píldoras pueden ser elaboradas adicionalmente en preparaciones con recubrimiento entérico. Las preparaciones líquidas para la administración oral incluyen preparaciones en emulsión, jarabe, elixir, suspensión y solución permisible para uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos utilizados habitualmente en dicho campo, por ejemplo, agua. Los liposomas han sido descritos como sistemas de liberación de fármacos para insulina y heparina (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.239.754). Más recientemente, se han utilizado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteinoideas) para liberar fármacos (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.925.673). Además, los compuestos portadores descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.879.681 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.871.753 utilizados para liberar agentes biológicamente activos por vía oral son conocidos en la técnica.

60 *Formulación y Administración Mucosal*

Para la absorción a través de superficies mucosas, las composiciones y métodos para administrar al menos un anticuerpo anti-integrina dual incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas submicrónicas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo, y una fase acuosa continua, que promueve la absorción a través de las superficies mucosales logrando la mucoadherencia de las partículas de la emulsión (Patente de los Estados Unidos Núms. 5.514.670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones de la presente invención

pueden incluir las rutas de administración corneal, conjuntiva, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para la administración por vía vaginal o rectal, por ejemplo, los supositorios, pueden contener excipientes, por ejemplo, polialquilenglicoles, vaselina, manteca de cacao, y similares. Las formulaciones para la administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas u oleosas de gotas nasales. Para la administración bucal los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.849.695).

10 *Formulación y Administración Transdérmica*

Para la administración transdérmica, el al menos un anticuerpo anti-integrina dual se encapsula en un dispositivo de liberación tal como un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsulas o microesferas (referidos colectivamente como micropartículas a menos que se indique lo contrario). Se conocen varios dispositivos adecuados, incluyendo micropartículas elaboradas a partir de polímeros sintéticos tales como ácidos polihidroxilados, como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfazenos y polímeros naturales tales como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y sus combinaciones (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.814.599).

20 *Administración y Formulaciones Prolongadas*

Puede ser a veces deseable liberar los compuestos de la presente invención al sujeto, durante periodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante períodos de una semana a un año a partir de una única administración. Se pueden utilizar diversas formas de liberación lenta, de depósito o de implante. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de los compuestos que tiene un bajo grado de solubilidad en los fluidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición de ácido con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, Ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácidos naftaleno mono- o di-sulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente tal como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de, por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo una sal tanato de cinc. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención o, preferiblemente, una sal relativamente insoluble tal como las que se acaban de describir, se pueden formular en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para ser inyectado. Las sales particularmente preferidas son las sales de cinc, las sales tanato de cinc, las sales pamoato, y similares. Otro tipo de formulación de depósito de liberación lenta inyectable podría contener el compuesto o la sal dispersados para encapsularlos en un polímero no antigénico, no tóxico, de degradación lenta tal como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919. Los compuestos o, preferiblemente, las sales relativamente insolubles tales como las descritas anteriormente también se puede formular en glóbulos silásticos de matriz de colesterol, en particular para su uso en animales. Las formulaciones de depósito o implante de liberación lenta adicionales, por ejemplo, liposomas de gas o líquido son conocidos en la literatura (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Después de haber descrito generalmente la invención, la misma será más fácilmente comprensible mediante la referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

50 *Ejemplo 1*

Clonación y Expresión del anticuerpo contra integrinas duales en Células de Mamífero

Un vector de expresión típico de mamíferos contiene al menos un elemento promotor, que media la iniciación de la transcripción del ARNm, la secuencia codificante del anticuerpo, y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Otros elementos incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias interpuestas flanqueadas por sitios donadores y aceptores de empalme del ARN. La transcripción de alta eficacia se puede lograr con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de Retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLVI, HIVI y el promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden utilizar elementos celulares (por ejemplo, el promotor de la actina humana). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, or pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) or pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL and PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) and pBC12MI (ATCC 67109). Las células anfitrionas de mamíferos que se pueden utilizar incluyen células Hela 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV 1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Alternativamente, el gen se puede expresar en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable, como dhfr, GPT, neomicina, e higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

5 El gen transfectado también puede ser amplificado para expresar grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador de la DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que llevan copias de varios cientos o incluso miles de genes de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintetasa (GS) (Murphy, *et al.*, *Biochem. J.* 227:277-279 (1991); Bebbington, *et al.*, *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). Utilizando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en un medio selectivo y se seleccionan las células con mayor
10 resistencia. Estas líneas celulares contienen el gen o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO se utilizan a menudo para la producción de anticuerpos.

Los vectores de expresión PC1 y PC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del Sarcoma de Rous (Cullen, *et al.* *Molec. Cél. Biol.* 5:438-447 (1985)) además de un fragmento del intensificador de CMV (Boshart, *et al.*, la célula 41:521-530 (1985)). Los sitios de clonación múltiple, por ejemplo, con los sitios de escisión para las enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el intrón 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de la preproinsulina de rata.

20 *Clonación y Expresión en Células CHO*

El vector PC4 se utiliza para la expresión de anticuerpos contra la integrina dual. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (Núm. de Acceso ATCC 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Las células de ovario de hámster chino u otras células que carecen de actividad
25 dihidrofolato que son transfectadas con estos plásmidos se pueden seleccionar haciendo crecer las células en un medio selectivo (por ejemplo, MEM menos alfa, Life Technologies, Gaithersburg, MD) con un suplemento del agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en las células resistentes a metotrexato (MTX), ha sido bien documentada (véase, por ejemplo, F. W. Alt, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990); and M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). Las células desarrolladas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco por sobreproducción de la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen DHFR. Si un segundo gen está conectado al gen DHFR, por lo general es co-amplificado y expresado al alza. Es conocido en la técnica que este enfoque se puede utilizar para desarrollar líneas celulares que transporten más de 1.000 copias del gen o los genes amplificados. Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen
30 amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula anfitriona.

El plásmido PC4 contiene para expresar el gen de interés el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del Sarcoma de Rous (Cullen, *et al.*, *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) además de un fragmento aislado del intensificador del gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, *et al.*, *Cell* 41:521-530 (1985)). Aguas abajo del promotor están los sitios de escisión para las enzimas de restricción BamHI, XbaI, y Asp718 que permitirán la integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de la preproinsulina de rata. Otros promotores de alta eficacia también se pueden utilizar para la expresión, por ejemplo, el promotor de la β -actina humana, los promotores tempranos o tardíos de SV40, o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV. Se pueden utilizar los sistemas de expresión Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares para expresar la integrina dual de una manera regulada en células de mamíferos (Gossen M. y H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 5.547-5.551 (1992)). Para la poliadenilación del ARNm se pueden utilizar también otras señales, por ejemplo, de la hormona del crecimiento humana o genes de la globina. También se pueden seleccionar líneas celulares estables que portan un gen de interés integrado en los cromosomas después de la co-transfección con un marcador seleccionable, tal como GPT, G418 o higromicina.
50 Es conveniente utilizar más de un marcador seleccionable al principio, por ejemplo, G418 más metotrexato.

El plásmido PC4 es digerido con enzimas de restricción y a continuación desfosforilado usando fosfatasa intestinal de ternera mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector es aislado de un gel de agarosa al 1%.

55 La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo completo contra una integrina dual que corresponde a las regiones variables HC y LC de un anticuerpo contra una integrina dual de la presente invención, se utiliza de acuerdo con las etapas del método conocido. En éste, también se utiliza el ácido nucleico aislado que codifica una región constante humana adecuada (es decir, las regiones HC y LC).

60 La variable aislada y la región constante que codifica el ADN y el vector desfosforilado se ligan después con ADN ligasa de T4. Luego se transforman las células *E. coli* HB101 o XL-1 Blue y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido PC4, utilizando, por ejemplo, análisis mediante enzimas de restricción.

Se utilizan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen DHFR activo para la transfección. Se co-transfectan 5 μ g del plásmido de expresión PC4 con 0,5 μ g del plásmido pSV2-neo usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se siembran en MEM menos alfa con un suplemento de 1 μ g/ml de G418. Al cabo de 2 días, las células se tripsinizan y se siembran en placas de clonación

ES 2 346 041 T3

de hibridomas (Greiner, Alemania) en MEM menos alfa con un suplemento de 10, 25 o 50 ng/ml de metotrexato más 1 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Después de aproximadamente 10-14 días los clones individuales se tripsinizan y después se siembran en placas Petri de 6 pocillos o en matraces de 10 ml utilizando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren después a nuevas placas de 6 pocillos que contienen las concentraciones más altas de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 a 200 mM. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia Western o mediante análisis HPLC de fase inversa.

10

Ejemplo 2

Método de elaboración y caracterización del ejemplo no limitante del anticuerpo contra la integrina dual humana completo

15

Resumen. Los ratones híbridos F₂ (CBA/J x C57/BL6/J) (Taylor *et al.*, International Immunology 6:579-591 (1993); Lonberg *et al.*, Nature 368:856-859 (1994); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)) que contenían los transgenes del anticuerpo de la región variable y constante humana para las cadenas tanto pesada como ligera se inmunizaron con $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ de placenta humana. Una fusión proporcionó 2 anticuerpos monoclonales IgG1k reactivos con $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ totalmente humanos, denominados GenO.95 y GenO.101. Los anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ totalmente humanos se caracterizaron adicionalmente y se encontró que ambos eran reactivos con los heterodímeros $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ sugiriendo especificidad para la cadena alfa compartida por ambas moléculas. Un Acm, GenO.95, también conocido como CNTO 95, inhibe la unión de $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ a vitronectina en ensayos basados en células.

25

Abreviaturas

BSA - albúmina de suero bovino

30

CO₂ - dióxido de carbono

DMSO - dimetilsulfóxido

35

EIA - inmunoensayo enzimático

FBS - suero fetal bovino

H₂O₂ - peróxido de hidrógeno

40

HC - cadena pesada

HRP - peroxidasa de rábano picante

45

Ig - inmunoglobulina

IP - intraperitoneal

IV - intravenosa

50

Acm - anticuerpo monoclonal

DO - densidad óptica

55

OPD - Dihidrocloreuro de o-fenilendiamina

PEG - polietilenglicol

PSA - penicilina, estreptomina, anfotericina

60

RT - temperatura ambiente

SQ - subcutánea

TBS - Tampón Tris salino

65

v/v - volumen por volumen

p/v - peso por unidad de volumen

Introducción

Los autores de la presente invención han utilizado ratones transgénicos que contienen genes humanos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos que son específicos de las integrinas αV . Estos anticuerpos novedosos se pueden utilizar terapéuticamente para inhibir el proceso angiogénico al bloquear la unión de las integrinas αV a sus respectivos ligandos de la MEC y proporcionar herramientas adicionales en el tratamiento de diversos cánceres.

10 Materiales y Métodos

Animales

Los ratones transgénicos que han sido desarrollados por GenPharm Internacional expresan inmunoglobulinas humanas, pero no IgM o Ig κ de ratón. Estos ratones contienen los transgenes de la secuencia humana que experimentan unión V(D)J, cambio de clase de cadena pesada y mutación somática para generar un repertorio de inmunoglobulinas de secuencia humana (Taylor *et al.*, International Immunology 6:579-591 (1993)). El transgén de la cadena ligera está derivado en parte de un clon de cromosoma artificial de levadura que incluye casi la mitad de la región V κ humana de la línea germinal. Además de varios genes VH, el transgén de la cadena pesada (HC) codifica μ humana y $\gamma 1$ humana (Lonberg *et al.*, Nature 368:856-859 (1994)) y/o regiones constantes $\gamma 3$. Se utilizó un ratón derivado del linaje genotípico HC012 en la inmunización y el proceso de fusión para generar estos anticuerpos monoclonales.

Purificación de $\alpha V\beta 3$ Humana

Se extrajeron células de placenta humana (despedazada con una picadora de carne) o células de melanoma humano M21 que expresan la integrina $\alpha V\beta 3$ con una solución salina que contenía Tris 20 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, Octiltioglucósido 100 mM (OTG de Pierce), azida de sodio al 0,05% y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (Sigma). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se aclaró mediante centrifugación a 10.000xg. El sobrenadante de los extractos de placenta se aplicó a una columna de afinidad que consistía en el Acm 10E5 acoplado a sefarosa (Pharmacia) para eliminar GPIIb/IIIa y la fracción de flujo continuo se aplicó a una columna de afinidad que consistía en Fab de Acm c7E3 acoplado a sefarosa (Pharmacia) para la unión a $\alpha V\beta 3$. La columna c7E3 se lavó con PBS que contenía CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, y OTG al 0,1% seguido de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM y OTG al 0,1%, pH 3,0. La columna se hizo eluir con glicina 0,1 M, ácido acético al 2%, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM y OTG al 0,1%. El producto eluido que contenía $\alpha V\beta 3$ purificada se neutralizó con Tris 2M, pH 8,5. La pureza de las preparaciones se caracterizó mediante análisis SDS-PAGE y ELISA para descartar la contaminación por GPIIb/IIIa (Wayner, *et al.*, J. Cell Biol. 113: 919-929 (1991)).

40 Inmunizaciones

Se inmunizó IP un ratón macho castrado quirúrgicamente de 17 semanas de edad obtenido de GenPharm (200 mL) y en 2 sitios SQ (100 μ L por sitio) con un total de 20 μ g de $\alpha V\beta 3$ placentaria (fracción V de preparación, JG21197) emulsionada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (día 0). El ratón fue inmunizado dos semanas después de la misma manera con $\alpha V\beta 3$ emulsionada con un volumen igual de coadyuvante incompleto de Freund. Se administraron tres inyecciones subsiguientes de 10 μ g IP/10 μ g SQ con adyuvante incompleto de Freund los días 28, 42 y 56. El ratón se desangró después los días 42 y 56 mediante punción retro-orbital sin anti-coagulante. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante una hora y el suero se recogió y se tituló utilizando un ensayo EIA en fase sólida para $\alpha V\beta 3$. La fusión, llamada GenO, se realizó cuando inyecciones repetidas no causaron el aumento de los títulos. En ese momento, al ratón con un título de IgG humana específico de 1:1280 contra $\alpha V\beta 3$ se le administró una inyección final IV de refuerzo de 10 μ g de $\alpha V\beta 3$ diluida en 100 μ L de solución salina fisiológica. Tres días después, el ratón fue sacrificado por dislocación cervical y el bazo fue retirado de forma aséptica y sumergido en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, y 0,25 μ g/ml de anfotericina B (PSA). Los esplenocitos se cosecharon perfundiendo en condiciones estériles el bazo con PSA-PBS. Las células se lavaron una vez en PSA-PBS frío, se contaron utilizando exclusión con colorante azul Tripán y se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía Hepes 25 mM.

Líneas Celulares

El compañero de fusión de mieloma de ratón no secretor SP2/0 fue recibido en el grupo Cell Biology Services (CBS) el 9-1-93. La línea celular se expandió en medio α MEM (modificado) (JRH Biosciences) con un suplemento de FBS al 10% (v/v) (Cell Culture Labs), piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM, L-glutamina 2 mM (todos de JRH Biosciences) y se crioconservó en FBS al 95% y DMSO al 5% (Sigma), luego se almacenó en un congelador de nitrógeno líquido en fase de vapor en el CBS. El banco de células era estéril (Quality Control Centocor, Malvem) y estaba libre de micoplasma (Bionique Laboratories). Las células se mantuvieron en cultivo en fase log hasta su fusión. Se lavaron en PBS, se contaron y se determinó la viabilidad (>95%) a través de la exclusión con colorante azul tripán antes de la fusión.

ES 2 346 041 T3

La línea celular M21, un melanoma humano que expresa las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, se expandió y se crioconservó. El banco de células de investigación de 10 viales fue recibido en el Cell Biology Services y almacenado en nitrógeno líquido. El banco de células era estéril y estaba libre de micoplasma (Bionique Laboratories). La línea celular MDAMB435L2, un carcinoma de mama humano, fue una donación de la Dra. Janet Price (MD Anderson, Houston TX) y expresa la integrina $\alpha V\beta 3$. La línea celular fue crioconservada en el Cell Biology Services. El banco de células era estéril y estaba libre de micoplasma (Bionique Laboratories). Las células M21 y MDAMB435L2 se descongelaron, se propagaron en los medios apropiados y se mantuvieron en fase log durante varios días antes de su uso en bioensayos o se dejó que alcanzaran la confluencia para su uso en la purificación de las proteínas $\alpha V\beta 3$ (células M21).

Fusión Celular

La fusión se llevó a cabo en una proporción 1:1 de células de mieloma murino (SP2/0) con respecto a células del bazo viables. Brevemente, las células del bazo y las células del mieloma se sedimentaron juntas. El sedimento se resuspendió lentamente, durante 30 segundos, en 1 ml de solución de PEG/PBS al 50% (p/v) (peso molecular de PEG 3000, Sigma) a 37°C. La fusión fue detenida añadiendo lentamente 1 mL de PBS de Dulbecco (JRH) (37°C) durante 1 minuto. Se añadieron 19 mL adicionales de PBS a lo largo de los siguientes 90 segundos. Las células fusionadas se centrifugaron durante 5 minutos a 750 rpm. Las células se resuspendieron después en medio HAT (medio α MEM que contenía Suero Fetal Bovino al 20% (JRH), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, de gentamicina de 10 mg/mL, suplemento de cultivo Origen al 2,5% (Fisher), 2-mercaptoetanol 50 mM, hipoxantina 100 mM, aminopterina 0,4 mM, y timidina 16 mM) y después se cultivaron en placa a 200 μ L/pocillo en trece placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Las placas se colocaron después en una incubadora a 37°C humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire durante 7-10 días.

Detección de Anticuerpos IgG Humanos anti- $\alpha V\beta 3$ en Suero de Ratón

Se utilizaron EIA en fase sólida para escrutar los sueros de ratón en busca de anticuerpos IgG humanos específicos para $\alpha V\beta 3$ humana. En resumen, las placas se recubrieron con $\alpha V\beta 3$ a 1 μ g/mL en PBS durante la noche. Después de lavar en solución salina 0,15 M que contenía Tween 20 al 0,02% (v/v), los pocillos se bloquearon con BSA al 1% (p/v) en HBSS con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, 200 μ L/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se utilizaron inmediatamente o se congelaron a -20°C para su uso futuro. Los sueros de ratón se incubaron en diluciones a la mitad en placas recubiertas con $\alpha V\beta 3$ a 50 μ L/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo y luego se sondearon con 50 μ L/pocillo de anti-IgG humana de cabra marcada con HRP, específico para Fc (Accurate) diluido 1:30.000 en BSA-PBS al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución sustrato de citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio 0,2 M, H₂O₂ al 0,01% y OPD de 1 mg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió solución de parada (ácido sulfúrico 4N) a 25 μ L/pocillo y las densidades ópticas se leyeron a 490 nm a través de un espectrofotómetro automático de placas.

Detección de Inmunoglobulinas Totalmente Humanas en Sobrenadantes de Hibridoma

Debido a que el ratón GenPharm es capaz de generar cadenas de inmunoglobulina tanto de ratón como humanas, se detectaron hibridomas de crecimiento positivo que secretan inmunoglobulinas completamente humanas utilizando dos sistemas de EIA separados. Las placas se recubrieron como se ha descrito anteriormente y los sobrenadantes de hibridoma sin diluir se incubaron en las placas durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron y se sondearon con anticuerpo de cabra anti-kappa humana marcada con HRP (Southern de Biotech) diluido 1:10.000 en BSA-HBSS al 1% o con anticuerpo de cabra específico anti-Fc de IgG humana marcado con HRP diluido 1:30.000 en BSA-HBSS al 1% durante una hora a 37°C. Las placas se incubaron con la solución sustrato como se ha descrito anteriormente.

Isotipaje

La determinación del isotipo de los anticuerpos se realizó utilizando un EIA en un formato similar al utilizado para escrutar el suero inmune del ratón en busca de títulos específicos. Se aplicó como recubrimiento $\alpha V\beta 3$ sobre placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente y el anticuerpo purificado a 2 μ g/mL se incubó sobre la placa durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y se sondeó con mediante anti-IgG₁ humana de cabra marcada con HRP (Binding Site) o anti-IgG₃ humana de cabra marcada HRP diluido 1:4000 (Zymed) en BSA-HBSS al 1% durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó nuevamente y se incubó con una solución sustrato como se ha descrito anteriormente.

Características Unión de los Anticuerpos Monoclonales Humanos Mediante EIA

Las características de unión de los anticuerpos se evaluaron utilizando un EIA de captura para $\alpha V\beta 3$. Se recubrieron placas Linbro con $\alpha V\beta 3$ a 1 μ g/ml en TBS con de calcio 2 mM durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron y bloquearon con TBS/BSA al 1%/calcio durante al menos una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos purificados

ES 2 346 041 T3

se incubaron en las diluciones a la mitad a partir de una concentración de partida de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas se lavaron y se añadieron los anticuerpos conjugados (anti-Fc de IgG humana de cabra marcada con HRP a 1:30.000) y se incubaron sobre placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadió sustrato OPD a los pocillos. Las placas se leyeron a través de un espectrofotómetro automático de placas.

5

Competición de la Unión de Gen095 a Células M21 por Diversos Acm anti-Integrina Comerciales

Las células M21 se tripsinizaron a partir de matraces de cultivo, se lavaron y se resuspendieron en HBSS/calcio a 2 x 10⁶ células/mL. Se marcó previamente Gen095 con FITC-anti-Fc humana de cabra (Jackson) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron 10X concentraciones de Gen095 de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con FITC-anti-IgG humana de cabra a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubaron alícuotas de 100 μL de células M21 (2 x 10⁵ células) con 12 μL de 10X Gen095 a concentraciones altas (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) y bajas (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final) \pm 12 μL de los anticuerpos murinos siguientes: anticuerpos IgG m7E3, anti- $\alpha\text{V}\beta 3$ (clon LM609, Chemicon), anti- $\alpha\text{V}\beta 5$ (clon P1F6, Gibco), anti- $\beta 3$ (Chemicon, AMAC), o anti- αV (clon VNR139, Gibco) (a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 45 minutos a 37°C. Se retiró una alícuota de cada tubo (para el análisis bicolor) y el resto se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo. Para el análisis bicolor, una alícuota (50 μL) se incubó con PE-anti-IgG ratón de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente para marcar anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 3$ murino, anti- $\alpha\text{V}\beta 3$, anti-c33, o anti- αV para el análisis bicolor. Todos los tubos se fijaron con paraformaldehído al 1%.

20

Inhibición de la Adherencia de las Células M21 o las Células MDAMB435L2 Dependiente de $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$ a placas recubiertas con Vitronectina con Acm Específicos de $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$

Se recubrieron placas Linbro durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de vitronectina (Collaborative, Becton Dickinson) a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en TBS con calcio 2 mM. Las placas se lavaron con HBSS/calcio y se bloquearon con TBS que contenía calcio 2 mM y BSA al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células M21 se tripsinizaron, se lavaron una vez con los medios que contenían FCS y se resuspendieron en 3 ml de HBSS sin calcio. Todos los lavados se realizaron con centrifugaciones de 10 minutos a 1000 rpm en una centrifuga de mesa Sorvall. Para el marcaje fluorescente de las células, se añadió calceína (Molecular Probes) (5 mg/mL en DMSO) a las células a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un tubo de 50 mL cónico (envuelto en papel de aluminio). Las células se incubaron durante 10 a 15 minutos a 37°C. Las células marcadas con calceína se lavaron una vez con HBSS y se resuspendieron en HBSS con un suplemento de BSA al 0,1% y MgCl_2 1 mM. Los anticuerpos se titularon (dilución seriada 1:14) en HBSS/BSA al 0,1%/calcio 2 mM a 10X concentración final. Las células (300 μL a 7,5 x 10⁶/mL) se preincubaron con titulaciones de anticuerpos (37 μL de la solución 10X) \pm ascitis anti- $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) (Chemicon) (37 μL de 1:600 (10X)) durante 15 min a 37°C. La mezcla de células-anticuerpos se añadió a las placas recubiertas con vitronectina a 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ por triplicado (aproximadamente 6 x 10⁵ células/pocillo). Las placas se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Las células no unidas se eliminaron mediante dos lavados con HBSS/calcio (150 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$). Se añadieron 100 μl de HBSS/calcio a cada pocillo y la placa se leyó en el Fluoroskan a 485-538 nm.

40

En un ensayo independiente, se cosecharon células de carcinoma de mama humano MDAMB435L2 con Versene y se suspendieron en medios sin suero a 500.000 células/mL y se incubaron con distintas concentraciones de Gen095. Después de 10 minutos de incubación, se añadió la suspensión de células tumorales (100 μL) a las placas Linbro recubiertas con vitronectina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37°C. Después de una hora, los pocillos se lavaron tres veces con medios sin suero (200 $\mu\text{L}/\text{lavado}$) y se añadió colorante Cell Titer AQ basado en MTT (Promega) a cada pocillo. El grado de adherencia celular se determinó en un lector de placas ELISA donde la DO490 nm es directamente proporcional a la adherencia celular. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo.

50

Determinación de la Dependencia de Ca^{++} para la Unión de Acm anti- $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$ Humana a Sus Ligandos

Para determinar la dependencia de los cationes en la unión de CNTO 95 y C372 a $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$, se utilizó un EIA en fase líquida. Se recubrieron placas de EIA (Corning) con Acm de IgG CNTO 95, C372, c7E3 o LM609 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de recubrimiento de carbonato durante la noche a 4EC. Las placas se bloquearon con BSA al 1% diluida en HBSS en presencia o ausencia de Ca^{++} 2 mM al menos durante una hora a 37°C. Se preincubaron diluciones a la mitad de $\alpha\text{V}\beta 3$ (log JG52599) o $\alpha\text{V}\beta 5$ (Chemicon) partiendo a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con EDTA 50 mM (Sigma) en BSA al 1%/HBSS sin Ca^{++} o con BSA al 1%/HBSS con Ca^{++} durante 30 minutos a 37°C. Las mezclas se añadieron después a las placas y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron después y se añadieron Acm no competitivos a las placas de la siguiente manera: a las placas recubiertas con CNTO 95, C372, c7E3 para detectar la unión de $\alpha\text{V}\beta 3$, se le añadió el Acm LM609 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en BSA al 1%/HBSS α Ca^{++} ; a la placa recubierta con LM609 para detectar la unión de $\alpha\text{V}\beta 3$, se le añadió el Acm CANTO 95 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en BSA al 1%/HBSS α Ca^{++} ; a las placas recubiertas con CNTO 95, C372, c7E3 para detectar la unión a $\alpha\text{V}\beta 5$, se les añadió Acm VNR139 (Gibco) a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en BSA al 1%/HBSS α Ca^{++} y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo y se sondearon con anti-Fc de IgG de ratón de cabra marcada con HRP o con anti-Fc de IgG humana de cabra marcada con HRP en un tampón adecuado y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron, se añadió sustrato OPD y se midió la DO490 como se ha descrito previamente.

65

ES 2 346 041 T3

Resultados y Discusión

Generación de Anticuerpos Monoclonales Anti-Integrina $\alpha V\beta 3$ Humana Totalmente Humanos

Una fusión, denominada GenO, se realizó a partir de un ratón GenPharm inmunizado con la proteína $\alpha V\beta 3$. A partir de esta fusión, se escrutaron 129 híbridos de crecimiento positivo. Se identificaron dos líneas celulares de hibridomas que secretaban anticuerpos IgG totalmente humanos reactivos con $\alpha V\beta 3$ humana. Estas dos líneas celulares, GenO.95.9.12 y GenO.101.17.22, secretan cada una inmunoglobulinas del isotipo IgG1k humano y ambas se subclonaron dos veces mediante dilución limitante para obtener líneas celulares estables (>90% homogéneas). A GenO.95.9.12 se le asignó el código C Núm. CNTO 95 y a GenO.101.17.22 se le asignó el código C Núm. C372A. Cada una de las líneas celulares se congeló en bancos celulares de investigación de 12 viales almacenados en LN2.

Características de Unión de los Anticuerpos Monoclonales Humanos mediante EIA

El análisis ELISA confirmó que los anticuerpos purificados de los dos hibridomas, CNTO 95 y C372A, se unen a $\alpha V\beta 3$ de una manera dependiente de la concentración. La Figura 1 muestra los resultados de la eficacia relativa de unión de los anticuerpos. Se consigue 50% de unión a 0,07 y 0,7 $\mu\text{g/mL}$ para C372A y CNTO 95 respectivamente. En el mismo ensayo, IgG de c7E3 demostró cincuenta por ciento de unión máxima a 0,07 $\mu\text{g/mL}$.

Competición de la Unión de Acm GenO95 a Células M21 Mediante Acm anti-Integrina Asequibles Comercialmente

Mediante el análisis de un solo color, ninguno de los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$, anti- $\alpha_v\beta_5$, anti- β_3 , o anti- α_v murinos compitió con CNTO 95 por la unión a las células M21 (Tabla 1). Este experimento también demuestra que CNTO 95 se une a las células M21 de una manera dependiente de la dosis. El análisis bicolor demostró que los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$, anti- $\alpha_v\beta_5$, anti- β_3 , o anti- α_v murinos fueron capaces de unirse a las células M21 (datos no mostrados).

TABLA 1

Competición de la Unión de GenO95 a las Células M21 mediante Acm anti-Integrina Murinos

Anticuerpo Competitivo	GenO95 marcado con FITC-anti-Fc humano de cabra			
	2 $\mu\text{g/mL}$		20 $\mu\text{g/mL}$	
	MCF	%Positivo	MCF	%Positivo
negativo (sin GenO95)	2,69		2,69	
Positivo (solución salina)	4,33	100%	14,33	100%
IgG m7E3	5,73	132%	14,72	103%
LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$)	4,78	110%	13,34	93%
anti- β_3 (Chemicon)	5,42	125%	13,10	91%
anti- β_3 (AMAC)	4,61	106%	13,10	91%
P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$)	4,87	112%	14,46	101%
VNR139 (anti- α_v)	4,61	106%	14,86	104%
MCF = Fluorescencia del Canal Medio				

ES 2 346 041 T3

Inhibición de la Adherencia Celular de Células M21 o MDAMB435L2 Dependiente de $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ a placas recubiertas de Vitronectina mediante Acm Específicos de $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$

Las M21 células se adhieren a placas de vitronectina recubiertas de una manera dependiente de $\alpha V\beta 5$ y $\alpha V\beta 3$. Por lo tanto, se requiere el bloqueo de $\alpha V\beta 3$ y de $\alpha V\beta 5$ para inhibir completamente la adherencia celular de M21 a placas recubiertas de vitronectina. C372A no inhibió la adherencia celular de M21 en presencia o ausencia de P1F6, ascitis anti- $\alpha V\beta 5$ (Figura 2). GenO95 (CNTO 95) inhibió completamente la adherencia celular de M21 a placas recubiertas con vitronectina y sin ascitis anti- $\alpha_v\beta_5$ (P1F6), lo que indica que el anticuerpo bloquea tanto $\alpha V\beta 3$ como $\alpha V\beta 5$. Como control de los parámetros de ensayo, se incluyó ReoPro (Fab c7E3) que bloquea $\alpha V\beta 3$ (además de GPIIb/IIIa). ReoPro solo inhibe sólo parcialmente la adherencia celular de M21, ReoPro en presencia de ascitis anti- $\alpha_v\beta_5$ (P1F6) inhibió completamente la adherencia, lo que demuestra que las células M21 se unen a la vitronectina a través de las integrinas tanto $\alpha_v\beta_3$ como $\alpha_v\beta_5$. Los datos fueron normalizados al porcentaje de unión máxima de las células M21 en ausencia de antagonista +/- ascitis anti- $\alpha V\beta 5$ (P1F6). Para la titulación del antagonista sin P1F6, los datos se normalizaron a la unión máxima de las células M21 en ausencia de antagonista o P1F6. Para la titulación del antagonista en presencia de P1F6, los datos se normalizaron a la unión máxima en ausencia de antagonista pero en presencia de P1F6. Los datos se representaron como el porcentaje de la unión máxima (sin anticuerpos) y la regresión no lineal se realizó utilizando GraphPad Prism.

El Acm GenO95 también demostró la capacidad de inhibir completamente la adherencia de las células MDAUB435L2 a la vitronectina a una concentración mínima de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3). Estos datos, combinados con los datos que indica la inhibición de la adherencia de las células M21, confirman la capacidad de GenO95 para inhibir funcionalmente la interacción del receptor de $\alpha V\beta 3$ y/o $\alpha V\beta 5$ con la vitronectina.

Determinación de la Dependencia de Ca^{++} para la Unión de Acm anti- $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$ Humanas a Sus Ligandos

Se sabe que la presencia del catión calcio es necesaria para que el Acm c7E3 se una a $\alpha V\beta 3$ y no es un requisito para la unión del Acm LM609 a $\alpha V\beta 3$ como se demuestra en las Figuras 4c y 4d respectivamente. Este experimento se llevó a cabo para evaluar si la dependencia de calcio también se aplica a las características de unión de CNTO 95 o C372 para las integrinas $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$. Una concentración en exceso de EDTA se introdujo en el formato de ensayo para quelar el Ca presente en el bolsillo de unión de los heterodímeros de integrina y por lo tanto, la unión se evaluó en ausencia del catión. Se encontró que la unión de CNTO 95 y C372 a $\alpha V\beta 3$ no depende de la presencia de Ca (Figura 4a, 4b). Lo mismo se verifica para la unión de CNTO 95 a $\alpha V\beta 5$ pero no así, sin embargo, para la unión de C372 a $\alpha V\beta 5$ (Figura 4e, 4f) puesto que la unión parece aumentar en presencia de Ca.

35

Conclusión

La fusión GenO se realizó utilizando esplenocitos de un ratón híbrido que contenía transgenes de anticuerpos de la región variable y constante humanos que se inmunizó con $\alpha V\beta 3$ humanas. Se generaron dos anticuerpos monoclonales IgG reactivos con $\alpha V\beta 3$ totalmente humanos del isotipo IgG1k. Estos Acm se caracterizaron adicionalmente y se encontró que ambos se unen a las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Se demostró que la unión de los dos Acm era independiente de calcio para $\alpha V\beta 3$ y dependiente de calcio para $\alpha V\beta 5$ sólo para la unión de C372. Por otra parte, un Acm, GenO95 (CNTO 95), es capaz de inhibir completamente la unión de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ al ligando vitronectina en ensayos basados en células. Este Acm se podría demostrar útil en aplicaciones anti-angiogénicas y otras relacionadas con el cáncer.

45

Referencias

50 1. Taylor *et al.*, *International Immunology* 6: 579-591 (1993).

2. Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994).

3. Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996).

55

4. Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996).

5. Gastl *et al.*, *Oncology* 54: 177-184 (1997).

60

6. Eliceiri, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 103: 1227-1230 (1999).

7. Friedlander *et al.*, *Science* 270: 1500-1502 (1995).

8. Wayner, *et al.*, *J. Cell Biol.* 113: 919-929 (1991).

65

Ejemplo 3

*Afinidades de Unión para el Anticuerpo Contra Integrinas Duales*5 *Introducción*

GenO.95, también conocido como CNTO 95, es un anticuerpo monoclonal humano generado inmunizando ratones híbridos F2 (CBA/J x C57/BL6/J, Internacional GenPharm) con $\alpha_v\beta_3$, la integrina purificada de placenta humana. El anticuerpo se compone de las regiones variable y constante de IgG1 kappa humana y se ha encontrado que es reactivo
10 tanto con $\alpha_v\beta_3$ como con $\alpha_v\beta_5$, lo que sugiere una especificidad para la cadena alfa compartida por las dos moléculas de integrina.

15 *Objetivo*

El propósito de este estudio es caracterizar la afinidad de unión de GenO.05 a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ purificadas y a las líneas celulares que expresan la integrina beta. Para una caracterización adicional, los valores de unión serán comparados entre GenO.95 y ReoPro.

20 *Abreviaturas*

Kd, constante de disociación en equilibrio, expresada en M

25 Bmax = número máximo de sitios de unión

*Materiales y métodos*30 *Líneas Celulares*

Se cultivaron células A375S2, una línea celular de melanoma humano que expresa las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, en medio mínimo de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS, Cell Culture Labs), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2 mM (todos de JRH Biosciences).

35 Se cultivaron células HT29, una línea celular de carcinoma de colon humano que expresa $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_v\beta_3$ mínima (NB 4546, p207) en DMEM que contenía FBS al 10%, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2 mM.

40 Se cultivaron células M21, un melanoma humano que expresa las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, obtenidas del Dr. J. Jakubowski (Eli Lilly, Inc.), en medio RPMI (JRH Biosciences) que contenía FBS al 10%, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y L-glutamina 2 mM.

45 *Integrinas*

Se purificó el lote JG22499 de $\alpha_v\beta_3$ en Centocor a partir de placenta humana. Se adquirió otro lote de integrina $\alpha_v\beta_3$ (formulación octilada, lote 19100991) de Chemicon. Se adquirió $\alpha_v\beta_5$ (formulación en Tritón, lote 20030055, lote 1910990 y formulación octilada, lote 19060747) de Chemicon.

50

Anticuerpos

Se purificó GenO.95 a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía con Proteína A. Se fabricó ReoPro en Centocor, Inc. Se adquirieron LM609, un anticuerpo murino anti- $\alpha_v\beta_3$ humana, (1976ZK, lote 20020559 y lote 1910329) y P1F6, un anticuerpo murino anti- $\alpha_v\beta_5$ humana (1961 P-K, lote 17110560) de Chemicon.

60 *Radiomarcaje*

Se radiomarcaron los anticuerpos con Na-I¹²⁵ (Amersham, IL) utilizando Iodobeads (Pierce Chemicals, IL) a una actividad específica de 1-2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Se determinó la concentración de anticuerpo (mg/ml) dividiendo la adsorción (DO/ml) a 280 nm por 1,4. Se determinó la actividad específica del anticuerpo yodado diluyendo el anticuerpo y sometiendo a recuento una alícuota en el contador gamma o Topcounter (Packard).

65

ES 2 346 041 T3

cpm/volumen (ml) x factor dilución

$$\text{Actividad específica (cpm/}\mu\text{g)} = \frac{\text{cpm/volumen (ml) x factor dilución}}{\text{concentración (}\mu\text{g/ml determinado por lectura a DO}_{490})}$$

5

Ensayo de unión a placas recubiertas con integrina

10 Se diluyó integrina $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ a $1 \mu\text{g/ml}$ en solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) que contenía cloruro de calcio 2 mM (TBS/Ca⁺⁺) y se aplicó como recubrimiento a $50 \mu\text{l}$ por pocillo sobre placas Linbro de poliestireno de 966 pocillos (Flow/ICN) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con TBS/Ca⁺⁺ y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en TBS/Ca⁺⁺ durante 1 h a la temperatura ambiente. Se añadieron cincuenta microlitros de anticuerpo diluido por triplicado a los pocillos recubiertos y se incubaron durante 15 2 h a 37°C. Después de tres lavados con tampón TBS-Tween (TBS + Tween 20 al 0,1%), se añadió F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa (H+L, Jackson lote 16869), a una dilución 1:40:000 en BSA-TBS al 1% y se incubó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces, y se revelaron con solución sustrato de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, Sigma) que consistía en ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sodio 20 0,2 M, H₂O₂ al 0,01% y 1 mg/ml de OPD. El desarrollo de color se detuvo después de 15 minutos a la temperatura ambiente con H₂SO₄ 0,3 N, y las placas se leyeron a una DO₄₉₀ nm en el lector de placa Molecular Dynamics.

20

Se generaron curvas de unión con GraphPad PRISM (versión 3, GraphPad Software). Los resultados se expresaron a un % de unión máxima del valor de saturación. La Kd, la constante de disociación de la unión en equilibrio (expresada como M), fue determinada a partir del ajuste de regresión no lineal de los datos utilizando PRISM.

25

Análisis de unión celular

30 Se añadieron $50 \mu\text{l}$ de anticuerpo radiomarcado diluido en medio RPMI al 2% que contenía albúmina de suero bovino al 2% (JRH Biosciences) por triplicado a células confluentes cultivadas en placas para el cultivo de tejidos de 96 pocillos (Packard). Las células se incubaron durante 1,5 h a 37°C; se lavaron suavemente tres veces con solución salina tamponada de Hanks que contenía calcio y magnesio (HBSS++, JRH Biosciences) y después se aspiraron. Se añadieron 100 microlitros de Mycosinct 20 (Packard) por pocillo, y se cuantificó la radiactividad unida a las células en el TopCounter (Packard).

35

Para determinar la unión no específica, se realizaron experimentos con un grupo similar de diluciones en presencia de un exceso de 100 veces de anticuerpo no marcado.

30 Para determinar el número de células cultivadas en placa en cada pocillo, se separaron las células de varios pocillos con tripsina, se reunieron y se contaron al microscopio. El número de receptores por célula se calculó como sigue:

40

cpm unidades específicas x $6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol

45

$$\text{Número de receptores/célula} = \frac{\text{cpm unidades específicas x } 6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\text{actividad específica (cpm/g) x peso mol. (g/mol) x núm. de células}}$$

50 Bmax, los sitios de unión máxima por célula, y la Kd fueron determinados a partir del ajuste de regresión no lineal de los datos utilizando PRISM.

Resultados y Discusión

55 La determinación de los valores de la afinidad de unión se realizó midiendo la unión de diferentes concentraciones de GenO.95 (y ReoPro) a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ purificadas y a los receptores de la superficie celular en equilibrio. Las curvas de unión a la saturación fueron hipérbolas rectangulares, sugiriendo un único sitio de unión al receptor para GenO.95 y ReoPro (Figs. 5-6; Motulsky H, 1999). Los análisis de estos datos de unión a la saturación (algunas veces denominados experimentos de Scatchard) se realizaron utilizando un ajuste de regresión no lineal de la hipérbola de un sitio en PRISM para obtener una afinidad, Kd, y un número de receptores, Bmax (Motulsky H, 1999).

60

Se utilizaron varios lotes de GenO.95, ReoPro e integrinas purificadas para asegurar una determinación exacta de los valores de afinidad en la unión. La curva de unión a la saturación de GenO.95 sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 5A) y la curva de unión de ReoPro sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 5B) representan la media y la desviación típica de seis experimentos por separado. Se encontró que los resultados obtenidos con la formulación en Tritón de $\alpha_v\beta_3$ eran más reproducibles que los obtenidos a partir de la formulación octilada. Sobre las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_3$, la Kd media de GenO.95 fue de $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ M; y la Kd de ReoPro media fue de $2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$ M.

65

ES 2 346 041 T3

La curva de unión a la saturación de GenO.95 sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (Fig. 6A) y la curva de unión de ReoPro sobre una placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (Fig. 6B) se muestran como la media y la desviación típica de seis experimentos separados. Los resultados obtenidos con la formulación octilada fueron más consistentes que los obtenidos con la formulación en Tritón. La Kd media de GenO.95 sobre $\alpha_v\beta_5$ fue de $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ M. ReoPro no mostró unión ni respuesta a la dosis sobre las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$.

Los valores de afinidad de unión para las integrinas purificadas se compararon con la unión a receptores expresados sobre diferentes líneas celulares. La Figura 7A-C muestra la unión de GenO.95- I^{125} con las células A375S2 que expresan $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (Fig. 7A). Los valores de la afinidad media sobre las células A375S2 fueron: Kd = $5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$ M; y 120.000 ± 37.000 receptores/célula. Las células HT-29 expresan $\alpha_v\beta_5$. Los valores de afinidad para la unión de GenO.95- I^{125} a las células HT-29 fueron: Kd = $1,3 \pm 3,76 \times 10^{-10}$ M; y 81.000 ± 24.000 receptores/célula (Fig. 7B). Las células M21 expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. La unión de GenO.95- I^{125} a las células M21 fue: Kd = $8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$ M; y 200.000 ± 80.000 receptores/célula (Fig. 7C).

Se realizaron estudios de unión a células similares con ReoPro- I^{125} sobre diferentes líneas celulares.

La Figura 8A-C muestra la unión de ReoPro- I^{125} con células A375S2 y los valores medios obtenidos fueron: Kd = $22 \pm 3,7 \times 10^{-9}$ M; y 370.000 ± 190.000 receptores/célula (Fig. 8A). Sobre las células HT-29, ReoPro- I^{125} mostró una unión mínima (Fig. 8B). La unión de ReoPro- I^{125} a las células M21 mostró: Kd = $10 \pm 2,00 \times 10^{-9}$ M y 660.000 ± 120.000 receptores/célula (Fig. 8C). Los valores de unión de ReoPro- I^{125} sobre las células M21 son coherentes con los valores publicados previamente (Tam *et al*, 1998).

En las Tablas 2-3 se muestra un resumen de los resultados de la unión.

TABLA 2

Resumen de las afinidades de GenO.95 y ReoPro hacia las integrinas purificadas

	Placa recubierta con $\alpha_v\beta_3$ (n = 6)	Placa recubierta con $\alpha_v\beta_5$ (n = 6)
	Kd (M)	Kd (M)
GenO.95	$2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$	$2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$
ReoPro	$2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$	Insignificante

TABLA 3

Resumen de las afinidades de GenO.95 y ReoPro hacia las células

	Células A375S2	Células A375S2	Células HT-29	Células HT-29	Células M21	Células M21
	Kd (M)	Receptores por célula	Kd (M)	Receptores por célula	Kd (M)	Receptores Por célula
GenO.95	$5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$ (n=5)	120.000 ± 37.000 (n=7)	$1,3 \pm 0,38 \times 10^{-9}$ (n=5)	81.000 ± 24.000 (n=7)	$8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$ (n=4)	200.000 ± 80.000 (n=8)
ReoPro	$22 \pm 3,7 \times 10^{-9}$	370.000 ± 190.000 (n=6)	Insignificante (n=4)	Insignificante (n=4)	$10 \pm 2,00 \times 10^{-9}$ (n=3)	660.000 ± 120.000 (n=7)

Se utilizaron cultivos en matriz de fibrina tridimensional para demostrar que este anticuerpo puede tener propiedades anti-angiogénicas potenciales.

5 Introducción

Existe en la actualidad una evidencia considerable de que el crecimiento progresivo del tumor depende de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos vasos sanguíneos proporcionan a los tumores nutrientes y oxígeno, eliminan los productos de desecho y actúan como conductos para la metástasis de las células tumorales en sitios distantes (1). Estudios recientes han definido adicionalmente diferentes papeles de las integrinas en el proceso angiogénico. Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas que juegan un importante papel en la mediación de la adherencia, la migración, la supervivencia, y la proliferación celular (2). La expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ es mínima en los vasos sanguíneos en reposo o normales pero está significativamente regulada al alza en las células vasculares angiogénicas (1-3). También se ha demostrado que la integrina $\alpha v\beta 5$ íntimamente relacionada pero distinta media el proceso angiogénico. Un anticuerpo generado contra $\alpha v\beta 3$ bloqueaba la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), mientras un anticuerpo específico para $\alpha v\beta 5$ inhibía la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (1-5).

La angiogénesis puede ser imitada *in vitro* por un análisis mediante brote endotelial. Este sistema implica la migración y proliferación de células endoteliales. GenO95 es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, y estas integrinas regulan la migración y proliferación de las células endoteliales. Por lo tanto, los autores de la presente invención determinaron si GenO95 podía inhibir el brote de las células endoteliales. Este ejemplo describe experimentos que demuestran que GenO95 inhibe el brote de células endoteliales humanas que se desarrollan en una matriz de fibrina.

25

Materiales

Se obtuvieron el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular humano 165 (VEGF₁₆₅) de R&D Systems (Minneapolis, MN). El MAB 1976Z (LM609), un anticuerpo monoclonal contra la integrina $\alpha v\beta 3$ y el MAB 1961 (PIF6), un anticuerpo monoclonal contra la integrina $\alpha v\beta 5$ se adquirieron de Chemicon (Temecula, CA). ReoPro y GenO95 se obtuvieron del Departamento de Tecnología de Anticuerpos y Farmacología Clínica de Centocor. El fibrinógeno humano (sin plasminógeno, proteína coagulable >95%) y la gelatina de piel bovina se adquirieron de Sigma (Saint Louis, MI).

35

Líneas Celulares

Las Huvec, células endoteliales de vena umbilical humana, se adquirieron de Clonetics (Walkersville, MA). Las Huvec se cultivaron en un kit con medio basal endotelial (EBM) (Clonetics) que contenía FBS al 10%, factor de crecimiento de tipo insulínico 1 long R, ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano, factor de crecimiento endotelial vascular humano, hFGF-b, sulfato de gentamicina, y anfotericina-B. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ y el medio se cambió cada 2 a 3 días. En todos los experimentos se utilizaron solamente de 3 a 8 pases.

45

Análisis de Brote basado en un Microportador de Fibrina

Se utilizó una modificación de los métodos de Nehls y Drenckhahn (6) para medir la formación de tubo capilar en matriz a base de fibrina tridimensional. Se prepararon microportadores Cytodex-3 recubiertos de gelatina (MC, Sigma) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se suspendieron los MC recién sometidos a autoclave en EBM-2 + FBS al 20% y se añadieron células endoteliales a una concentración final de 40 células/MC. Se dejó que las células se anclaran a los MC durante una incubación de 4 horas a 37°C. Los MC se suspendieron después en un gran volumen de medio y se cultivaron durante 2 a 4 días a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂. Los MC se agitaron ocasionalmente para evitar la agregación de las cuentas recubiertas de células. Los MC se embebieron en un gel de fibrina que se había preparado como sigue: se disolvió fibrinógeno humano (2 mg/ml) en medio EBM-2 plano que contenía bFGF o suero. Esta solución también contenía diferentes anticuerpos. Para evitar el exceso de fibrinolisis por las células embebidas en fibrina, se añadió aprotinina a la solución de fibrinógeno y al medio de crecimiento a 200 U/ml. Se añadieron los microportadores recubiertos de células a la solución de fibrinógeno a una densidad de 100 a 200 MC/ml (50-100 cuentas/pocillo-placa de 48 pocillos) y se indujo la coagulación mediante la adición de trombina (0,5 U/ml). Una vez completada la coagulación, se añadieron 0,5 ml de solución (que contenía todos los componentes descritos antes excepto fibrinógeno y trombina) a las matrices de fibrina. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 1 a 3 días. Después de 1-3 días, se fijaron los geles con paraformaldehído al 3% disuelto en PBS, y se cuantificó el número de brotes capilares con una longitud que excediera el diámetro de la cuenta de MC (150 μ m).

65

Resultados y Discusión

Las HUVEC pueden formar brotes de tipo capilar cuando se cultivan en un gel de fibrina (Figura 9). Las células endoteliales migran hacia el exterior desde las cuentas recubiertas de gelatina y se prolongan en largos filopodios. Los brotes largos consisten en varias células que forman un lumen. Este proceso se asemeja a la formación de microcapilares *in vivo*, debido a que implica migración, invasión y proliferación celular de células endoteliales. La cuantificación de la formación de brotes reveló que GenO95 inhibía la formación de brotes de células endoteliales en medio con bFGF o completo (Figura 10). La combinación de LM609 y P1F6 inhibía rutinariamente el brote más eficazmente que GenO95 (Figura 11).

Conclusión

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes es un rasgo distintivo de angiogénesis. Este proceso puede ser imitado *in vitro* mediante el ensayo del brote endotelial. Estos brotes representan los microcapilares que se forman en respuesta a los estímulos angiogénicos tales como bFGF o una variedad de estímulos que están presentes en el suero. GenO95 inhibía de una manera dependiente de la dosis el brote de células endoteliales estimulado por medio con bFGF y completo, sugiriendo que este anticuerpo puede inhibir eficazmente la función de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. Se desconoce por qué GenO95 no era tan eficaz como la combinación de LM609 y P1F6, pero es posible que GenO95 reconozca $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ con una afinidad menor en comparación con LM609 y P1F6, respectivamente. En conjunto, estos datos demuestran que GenO95 puede inhibir el complejo proceso de formación de microcapilares *in vitro*.

Referencias

1. **Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, y Kraft A.** 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54: 177-184.
2. **Eliceiri BP, y Cheresh DA.** 1999. The role of αV integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 1227-1230.
3. **Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA,** 1994. Integrin $\alpha v\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.
4. **Enenstein J, Walweh NS, y Kramer RH.** 1992. Basic FGF and TGF- β differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 203: 499-503.
5. **Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, y Cheresh DA.** 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct αV integrins. *Science* 270: 1500-1502.
6. **Nehls, V y Drenckhahn, D.** 1995. A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvascular Res.* 50: 311-322.

Ejemplo 5

Efecto del anticuerpo Contra Integrinas Duales sobre la Adherencia, la Migración y la Invasión de las Células Endoteliales y Tumorales

Resumen

Se inmunizaron ratones híbridos F₂ (CBA/J x C57/BL6/J) (1-4) que contenían transgenes para el anticuerpo de la región variable y constante humana para las cadenas tanto pesada como ligera con $\alpha v\beta 3$ de placenta humana. Una fusión proporcionó un anticuerpo monoclonal IgGk reactivo con $\alpha v\beta 3$ totalmente humano denominado GenO95. Se encontró que el anticuerpo totalmente humano era reactivo con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (5). Estas integrinas participan en la adherencia, la migración, y la invasión de las células endoteliales y tumorales. Por lo tanto, los autores de la presente invención caracterizaron el efecto de GenO95 sobre la motilidad celular mediada por integrina. GenO95 inhibe la unión de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y de melanoma humano a vitronectina, colágeno desnaturalizado, fibrinógeno y fibrina, pero no bloquea la adherencia celular a fibronectina y a colágeno de tipo I. GenO95 también inhibe la migración de células endoteliales que han sido estimuladas con factor de crecimiento de fibroblastos básico y suero a una dosis baja. GenO95 inhibe la invasión de las células tumorales a través de un gel de fibrina. En conclusión, GenO95 bloquea funcionalmente $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ en una variedad de ensayos basados en células *in vitro*.

Abreviaturas

- BSA - albúmina de suero bovino
- 5 CO₂ - dióxido de carbono
- DMSO - dimetilsulfóxido
- FBS - suero bovino fetal
- 10 Ig - inmunoglobulina
- Acm - anticuerpo monoclonal
- 15 DO - densidad óptica
- RT - temperatura ambiente
- HUVEC - células endoteliales de vena umbilical humana
- 20 bFGF - factor de crecimiento de fibroblastos básico bovino

Introducción

- 25 Existe ahora una evidencia considerable de que el crecimiento progresivo del tumor es dependiente de la angiogé-
nesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos proporciona a los tumores nutrientes y oxígeno, elimina los productos
de desecho y actúa como conductos para la diseminación de las células tumorales a sitios distantes. Varios estudios
han definido el papel de las integrinas en el proceso angiogénico. Las integrinas son proteínas transmembrana hete-
30 rodiméricas que juegan un papel crítico en la adherencia de las células a la matriz extracelular (MEC) y median la
supervivencia, la proliferación y la migración celulares (6). Durante el proceso angiogénico, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ son regu-
ladas al alza sobre la superficie de las células endoteliales activadas, lo que a su vez ayuda a estas células a migrar
y proliferar (6). Un anticuerpo generado contra $\alpha v\beta 3$ bloquea la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento
de fibroblastos básico (bFGF), mientras un anticuerpo específico para $\alpha v\beta 5$ inhibe la angiogénesis inducida por el
35 factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (6,7). Además de regular la angiogénesis, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha v\beta 3$ regulan la
adherencia, migración e invasión celulares, procesos requeridos para la metástasis de las células tumorales. Estudios
previos indicaron que Gen095 se une a las integrinas $\alpha v\beta 5$ y $\alpha v\beta 3$ purificadas, por lo tanto, los autores de la presente
invención determinaron si este anticuerpo podía bloquear funcionalmente la adherencia, migración e invasión de las
células endoteliales y tumorales mediada por $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$.

40 *Materiales y Métodos*

Materiales

- 45 Se obtuvieron el factor de crecimiento de fibroblastos bovino (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular
humano 165 (VEGF₁₆₅) de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se adquirieron MAB 1976Z (LM609), un anticuerpo
monoclonal contra la integrina $\alpha v\beta 3$ y MAB1961 (PIF6), un anticuerpo monoclonal contra la integrina $\alpha v\beta 5$ de
Chemicon (Temecula, CA). Se obtuvieron ReoPro (lote: 94A04ZE) y Gen095 (lot: JG100899) de Centocor. Los
insertos de cultivo celular BIOCOAT (tamaño de poro: 8 μ m) fueron adquiridos de Becton Dickinson (Bedford, MA).
50 El kit de análisis de adherencia de células Vybrant™ (V-13181) fue adquirido de Molecular Probes (Eugene, OR). El
fibrinógeno libre de plasminógeno humano (agotado para VWF/Fn) fue adquirido de Enzyme Research Labs (South
Bend, IN). La gelatina de piel bovina fue adquirida de Sigma (Saint Louis, MO). Se adquirió vitronectina humana de
Promega (Madison, WI), y se adquirió el colágeno de tipo I de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD).

55 *Líneas Celulares*

- Se adquirieron las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), de Clonetics (Walkersville, MA), y
se cultivaron en un kit con medio EBM (Clonetics) que contenía FBS al 10%, factor de crecimiento de tipo insulínico
60 1 long R, ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano, factor de crecimiento endotelial
vascular humano, sulfato de gentamicina y anfotericina-B. Las células se hicieron crecer a 37°C y 5% de CO₂ y
el medio se cambió cada 2 a 3 días. Las células se hicieron pasar cuando alcanzaron una confluencia del 80%. Se
utilizaron de 3 a 8 pases en todos los experimentos.

- 65 La línea celular de melanoma humano A375S.2 que expresaba las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ se obtuvo de Centocor
Cell Bank donde la línea celular se consideraba libre de micoplasma y contaminantes bacterianos. Las células se culti-
varon en medio DMEM con un suplemento de FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos
no esenciales 0,1 mM.

ES 2 346 041 T3

Se obtuvieron células HT29 de carcinoma de colon humano de Centocor Cell Biology Service Department, donde se consideró que la línea celular estaba libre de micoplasma y contaminantes bacterianos. Las células se cultivaron en un medio α -MEM con un suplemento de FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, y aminoácidos no esenciales 0,1 mM.

5

Citometría de Flujo

Para la detección de integrinas superficiales, se cosecharon las células, se enjuagaron, se suspendieron en medio RPMI sin suplemento, y se incubaron sucesivamente durante 60 minutos sobre hielo con Acm, anti-integrina (10 $\mu\text{g/ml}$) y anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC (1:100) o anticuerpo anti-integrina marcado con FITC (10 $\mu\text{g/ml}$). La ausencia de anticuerpo primario o la sustitución del anticuerpo primario por anticuerpo de isotipo coincidente sirvieron como control negativo. Las células se analizaron inmediatamente con un citómetro de flujo FACS Scan II (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

15

Análisis de Adherencia

Las placas de microtitulación (Linbro-Titertek, ICN Biomedicals, Inc) se recubrieron a 4°C durante la noche con vitronectina (1 $\mu\text{g/ml}$), gelatina (0,1 %), fibrinógeno (100 $\mu\text{g/ml}$), colágeno de tipo I (10 $\mu\text{g/ml}$), o fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$). Inmediatamente antes de su uso las placas se enjuagaron con PBS y se bloquearon durante 1 hora con BSA/PBS al 1% (pH 7,4). Se formaron pocillos de microtitulación recubiertos con fibrina mediante tratamiento con trombina (1U/ml) de fibrinógeno. Las células adherentes (HUVEC HT29 y A375S.2) se marcaron con colorante fluorescente Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se recogieron, se lavaron dos veces, y se suspendieron en BSA al 0,1% en medio DMEM. Después de ajustar la densidad celular a $5 \times 10^5/\text{ml}$, las células se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos durante 15 min a 37°C. La mezcla de células-anticuerpo se añadió a los pocillos (100 μl por pocillo) y se incubó durante 1 h a 37°C. Las placas se enjuagaron dos veces con PBS para separar las células no unidas y se midió la adherencia en un lector de fluorescencia de las placas (Fluoroskan) a 485-538 nm. La adherencia celular a los pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. Los anticuerpos de isotipo coincidente sirvieron como control negativo.

30

Análisis de Migración Quimiotáctica

Se realizaron ensayos de migración celular en cámaras Transwell-24 con una membrana de poliestireno (diámetro 6,5 mm, grosor 10 μm , y un tamaño de poro de 8 μm). Los cultivos de células de 24 horas sub-confluentes (HUVEC o A375S.2) se cosecharon con tripsina-EDTA, se lavaron dos veces, y se resuspendieron en su respectivo medio sin suero que contenía BSA al 0,1%. Se añadieron las células (100.000/500 μl) a la cámara superior en presencia o ausencia de anticuerpos. Para facilitar la migración quimiotáctica de las células, se añadieron 750 μl de medio que contenía BSA al 0,1% y vitronectina (2 $\mu\text{g/ml}$) o suero (2% para HUVEC y 10% para las células A375S2) a las cámaras de la base y la placa se colocó en una incubadora de cultivos de tejido. La migración se terminó después de 4 a 8 horas separando las células de la parte superior con un bastoncillo de algodón y después se fijaron los filtros con paraformaldehído al 3% y se tiñeron con Cristal Violeta. Se determinó el grado de migración celular mediante microscopía óptica y se analizaron las imágenes utilizando el soporte lógico para el análisis de imágenes Phase 3 (Glen Mills, PA). El soporte lógico analiza la zona total ocupada por las células teñidas en el lado inferior del filtro y ésta es directamente proporcional al grado de migración celular.

45

Análisis Haptotático de Migración

50

Se realizaron análisis de migración celular utilizando las cámaras Transwell como se ha descrito antes con ligeras modificaciones. En resumen, el lado inferior de la membrana se recubrió con vitronectina (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 60 minutos a la temperatura ambiente, y después se bloqueó con una solución de BSA/PBS al 1% a la temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, las membranas se lavaron con PBS y se secaron al aire. Se añadió medio sin suero (750 μl) que contenía BSA y bFGF al 0,1% (20 ng/ml) a las cámaras inferiores. Los cultivos de 24 h sub-confluentes se cosecharon con tripsina-EDTA, se lavaron dos veces, y se resuspendieron en medio sin suero. Se añadieron células (100.000/500 μl) a las cámaras superiores en presencia o ausencia de anticuerpos. Las cámaras se colocaron en una incubadora para el cultivo de tejidos y se dejó que la migración prosiguiera durante 6 h. El grado de migración celular se determinó como se ha descrito antes.

60

Análisis de Invasión

Se mezclaron fibrinógeno (sin plasminógeno, 100 μl de 10 mg/ml) y 100 μl de 1 U/ml de trombina e inmediatamente se añadieron a la cámara superior de placas Transwell de 24 pocillos (6,5 mm de diámetro, 10 μm de grosor y un tamaño de poro de 8,0 μm , Costar). Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos para formar un gel de fibrina. Las células tumorales confluentes (A375S.2) se trataron con tripsina, se centrifugaron, se resuspendieron en medio basal con un suplemento de BSA al 0,1% y 10 $\mu\text{g/ml}$ de plasminógeno (Enzyme Research Labs, South Bend,

65

IN) con diferentes concentraciones de anticuerpos, y se incubaron durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Las células (100.00/500 μ l) se añadieron a la cámara superior en presencia o ausencia de anticuerpos. El compartimento inferior de la cámara de invasión se llenó con 0,75 ml de FBS-DMEM al 10%, que sirvió como quimioatrayente y la placa se transfirió a una incubadora para el cultivo de tejidos. Después de 24 horas, la invasión se terminó separando las células de la parte superior con un bastoncillo de algodón, y los filtros se fijaron con paraformaldehído al 3% y se tiñeron con Cristal Violeta. El grado de migración celular se analizó utilizando el soporte lógico para el análisis de imágenes Phase 3 como se ha descrito antes.

10 *Resultados y Discusión*

Gen095 inhibe la adherencia celular mediada por α v β 3 y α v β 5

Puesto que Gen095 se une a las integrinas α v β 3 y α v β 5, los autores de la presente invención determinaron si sus células tumorales (A375S.2 y HT29) y sus células endoteliales expresaban estas integrinas. La citometría de flujo indicó que las células A375S.2 y HUVEC expresan las integrinas tanto α v β 3 como α v β 5, pero las células HT29 expresan α v β 5, pero no la integrina α v β 3 (Figura 12A-I).

Las células HT29 (12A, B y C) expresan α v β 5, pero no la integrina α v β 3 sobre su superficie. Las células HUVEC (12D, E y F) y A375S.2 (12G, H y I) expresan la integrina α v β 5 y α v β 3 sobre su superficie. Se tiñeron las células tumorales y endoteliales mediante inmunofluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo. El histograma de la izquierda representa la fluorescencia de fondo en presencia de anticuerpo de isotipo coincidente. El histograma de la derecha indica tinción positiva. A, D, G, LM609 (Acm dirigido a α v β 3, 10 μ g/ml); B, E, H, PIF6 (Acm dirigido a α v β 5, 10 μ g/ml); y C, F, I, Gen095 (10 μ g/ml).

Se determinó con detalle el efecto de Gen095 sobre la adherencia de células HUVEC, A375S.2 y HT 29 a diferentes proteínas de la matriz. Gen095 inhibía completamente la adherencia de las células HUVEC y A375S.2 a vitronectina, y parcialmente a placas recubiertas con fibrinógeno, gelatina y fibrina, indicando que el anticuerpo puede bloquear α v β 3 y α v β 5 (Figuras 2 y 3).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5. Adherencia de células A375S.2 a vitronectina, gelatina, fibrinógeno, fibrina, fibronectina y colágeno de tipo I. El grado de adherencia celular en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo se trazó como un porcentaje de la adherencia celular en ausencia de anticuerpo que se consideró como 100%. Cada dato puntual es la media de determinaciones por triplicado (+/-DT). La concentración de los anticuerpos utilizados es de 10 µg/ml.

Adherencia (%) +/- DT

	Vitronectina	Gelatina	Fibrinógeno	Fibrina	Fibronectina	Colágeno de tipo I
IgG Humana	104,0 ± 5,3	94,6 ± 12,4	102,5 ± 5,9	99,5 ± 4,0	100,0 ± 5,5	99,1 ± 3,3
LM609	42,1 ± 6,1	25,2 ± 7,1	14,0 ± 1,8	50,0 ± 1,9	104,0 ± 8,1	100,0 ± 1,5
PIF6	28,5 ± 3,8	87,4 ± 7,8	99,4 ± 3,6	92,9 ± 4,7	101,0 ± 5,7	101,0 ± 7,3
LM609-PIF6	0,9 ± 0,3	1,1 ± 1,5	10,3 ± 2,6	47,6 ± 3,2	109,0 ± 4,1	102,0 ± 4,6
Gen095	1,4 ± 0,4	23,2 ± 7,2	11,4 ± 2,8	43,3 ± 3,5	103,0 ± 4,5	104,0 ± 5,9
ReoPro	38,1 ± 0,7	6,0 ± 1,0	6,5 ± 2,1	12,9 ± 3,8	104,0 ± 5,6	93,1 ± 3,1

Adherencia de células HT29 de carcinoma de colon humano a vitronectina. El análisis de adherencia se realizó como se describe en Métodos. La adherencia celular a pocillos recubiertos con BSA sirvió como control negativo. Los datos de la Figura 15 se trazan como el porcentaje de unión máxima (ausencia de anticuerpo), y son la media de determinaciones por triplicado (+/-DT).

5

GenO95 bloquea la migración de células de melanoma y endoteliales humanas

Las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ participan en la migración celular, por lo tanto los autores de la presente invención determinaron si GenO95 podría bloquear la migración celular estimulada por vitronectina. La migración celular estimulada por vitronectina implica a $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. GenO95 inhibía de una manera dependiente de la dosis la migración de células endoteliales cuando se utilizaba vitronectina como quimioatrayente (Figuras 5 y 6). De manera interesante, GenO95 también inhibía la migración de las células tanto HUVEC como A375S.2 hacia el suero (Figuras 7-8). Estos descubrimientos podían ser potencialmente importantes para la terapia angiogénica y tumoral debido a que sugieren que las dianas para GenO95, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, son receptores centrales que están activados por una variedad de factores migratorios que están presentes en el suero.

15

Migración de HUVEC hacia 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina. El análisis se realizó como se describe en Métodos y se dejó que las células migraran durante 6 h. Las fotomicrografías son campos representativos (lente del objetivo 10x) de la migración celular en la Figura 16A, ausencia de anticuerpos, (16B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), (16C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 16D es una representación gráfica de la migración celular en presencia de concentraciones variables de GenO95. Los datos se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideraba como el 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT).

20

Migración de HUVEC hacia 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina en presencia de anticuerpos para $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. El análisis de migración se realizó como se describe en Métodos, y se dejó que las células migraran durante 6 horas. LM609 y P1F6 son Acm dirigidos a $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, respectivamente. Los datos mostrados en la Figura 17 fueron normalizados al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideró como el 100%, y cada barra es la media de tres filtros Transwell (+/- DT). La BSA, la IgG de ratón y la IgG humana sirvieron como controles negativos. LM609-P1F6 representa combinaciones de ambos anticuerpos. Los anticuerpos y la BSA se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

25

30

Migración de HUVEC hacia FBS al 2%. Se dejó que el análisis de migración continuara durante 4 h y se capturaron los datos como se describe en Métodos. La Figura 18(A) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de LM609, P1F6, combinación de LM609+P1F6, anticuerpos de control de isotipo coincidente (humano y de ratón). Se utilizaron los anticuerpos y las proteínas a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 18(B) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de ReoPro y GenO95. Las fotomicrografías son campos representativos (lente del objetivo 10x) de la migración celular en la Figura 18(C), la ausencia de anticuerpo, Figura 18(D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y Figura 18(E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$). Los datos se normalizaron al porcentaje de control (sin anticuerpo) que se consideró como el 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/-DT).

35

40

Migración de células A375S.2 hacia FBS al 10%. Se dejó que el análisis de migración prosiguiera durante 4 h y se capturaron los datos como se describe en Métodos. Los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 19(A) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de concentraciones variables de GenO95. La Figura 19(B) es una representación gráfica de la migración celular en presencia de LM609, P1F6, una combinación de LM609+P1F6, anticuerpos de control de isotipo coincidente (humano y de ratón). Los datos se normalizaron al porcentaje del control, que se consideró como el 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/-DT). Las fotomicrografías son campos representativos (lente del objetivo 10x) de la migración celular en la Figura 19(C), ausencia de anticuerpo, Figura 19(D), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$), y Figura 19(E), GenO95 (20 $\mu\text{g/ml}$).

45

50

Los resultados descritos antes indican que GenO95 bloquea la migración tumoral y endotelial a vitronectina y suero. A continuación, los autores de la presente invención determinaron si este anticuerpo podría inhibir la migración celular estimulada por bFGF. Como se muestra en la Figura 9, bFGF estimulaba la migración de células HUVEC hacia la vitronectina, y GenO95 bloqueaba significativamente esta migración celular estimulada.

55

Migración de HUVEC hacia vitronectina en presencia de bFGF. Se recubrieron los lados inferiores de los filtros de las cámaras de migración con 2 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina, y el análisis se realizó como se ha descrito en Métodos. Se dejó que las células migraran durante 6 h. En la Figura 20A-E, cada dato puntual es la media de 3 filtros Transwell (+/- DT). Figura 20(A), bFGF; Figura 20(B), GenO95 (5 $\mu\text{g/ml}$); Figura 20 (C), GenO95 (40 $\mu\text{g/ml}$); Figura 20 (D), sin-bFGF. Figura 20 (E), muestra gráficamente la inhibición de la migración celular en presencia de diferentes anticuerpos.

60

GenO95 bloquea la invasión de células de melanoma humano

Los resultados descritos antes indican que GenO95 puede inhibir la adherencia y la migración celular. Por lo tanto, los autores de la presente invención se cuestionaron si este anticuerpo podría bloquear la invasión de células tumorales, un procedimiento de múltiples etapas que implica adherencia celular, degradación de la matriz, y migración de las células a través de la matriz degradada. Los autores de la presente invención eligieron fibrina como matriz para las

65

células tumorales debido a que Gen095 era capaz de bloquear la adherencia de las células tumorales a la fibrina (Figura 3). Como se muestra en la Figura 10, la invasión de las células A375S.2 podía ser inhibida por LM609, sugiriendo la implicación de al menos $\alpha v\beta 3$ en este proceso. Gen095 inhibía de una manera dependiente de la dosis la invasión de las células tumorales a través de la fibrina. Una IgG irrelevante y un Acm dirigido a las plaquetas GPIIb/IIIa (10E5) sirvieron como controles negativos. En conjunto, estos datos sugieren que Gen095 puede bloquear eficazmente la invasión de células de melanoma humano.

Invasión de células A375S.2 a través de un gel de fibrina (5 mg/ml). Se dejó que el análisis de invasión prosiguiera durante 24 h y se capturaron los datos como se describe en Métodos. Las fotomicrografías son campos representativos (lente del objetivo 4x) de la invasión celular en la Figura 21(A) la ausencia de anticuerpos, Figura 21(B) Gen095 (10 $\mu\text{g/ml}$), Figura 21(C) y (D) son una representación gráfica de la invasión celular en presencia de Gen095, 10E5 F (ab')₂, LM609, P1F6, LM-PIF6 (LM609+P1F6), IgG humana y de ratón (H-IgG y M-IgG). Gráfico Figura 21(D): La concentración de todos los anticuerpos y proteínas es de 10 $\mu\text{g/ml}$. Los datos se normalizaron al porcentaje del control (sin anticuerpo) que se consideró como 100%, y cada punto es la media de tres filtros Transwell (+/- DT).

Conclusión

La adherencia, la migración y la invasión celulares requieren integrinas tales como $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. Gen095 es capaz de bloquear funcionalmente las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ que son expresadas por las células endoteliales y tumorales. Gen095 fue capaz de bloquear la migración y la invasión de células que estaban estimuladas por bFGF o suero. Estos resultados sugieren que Gen095 es un potente inhibidor de las células tumorales y endoteliales que expresaban las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$.

Referencias

1. Taylor, L. D., C. E. Carmack, D. Huszar, K. M. Higgins, R. Mashayekh, G. Sequar, S. R. Schramm, C-C. Kuo, S. L. O'Donnell, R. M. Kay, C. S. Woodhouse, y N. Lonberg. 1993. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *International Immunology* 6: 579-591.

2. Lonberg, N., L. D. Taylor, F. A. Harding, M. Trounstein, K. M. Higgins, S. R. Schramm, C-C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J. G. McCabe, D. Munoz-O'Regan, S. L. O'Donnell, E. S. G. Lapachet, T. Bengoechea, D. M. Fishwild, C. E. Carmack, R. M. Kay, y D. Huszar. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368: 856-859.

3. Neuberger, M. 1996. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nature Biotechnology* 14: 826.

4. Fishwild, D. M., S. L. O'Donnell, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, y N. Lonberg. 1996. High-avidity human IgG monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature Biotechnology* 14:845-851.

5. Gastl, G., T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, y A. Krafl. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54: 177-184.

6. Eliceiri, B. P., y D. A. Cheresh. 1999. The role of αV integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 1227-1230.

7. Friedlander M., P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, y D. A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct αV integrins. *Science* 270: 1500-1502.

Resultará evidente que la invención se puede poner en práctica de un modo diferente al descrito concretamente en la descripción y en los ejemplos precedentes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:7 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:8, donde el fragmento de unión al antígeno se selecciona entre un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, facb, Fv o scFv.
- 10 2. Un anticuerpo monoclonal humano aislado de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se une a las integrinas Alfa V Beta 3 y Alfa V Beta 5 humanas con una KD de 10⁻⁷ M o menor.
- 15 4. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se une a las integrinas Alfa V Beta 3 y Alfa V Beta 5 humanas con una KD o 10⁻⁸ M o menor.
5. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se une a las integrinas alfa V Beta 3 y Alfa V Beta 5 humanas con una KD de 10⁻⁹ M o menor.
- 20 6. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores producido por un hibridoma, donde el hibridoma se prepara a partir de una célula B obtenida de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen o un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transgén o un transcromosoma de la cadena ligera humana, fusionados a una célula inmortalizada.
- 25 7. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo neutraliza esencialmente al menos una actividad de las proteínas integrina Alfa V Beta 3 y Alfa V Beta 5 humanas o sus fragmentos.
- 30 8. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que inhibe completamente la adherencia de las células M21 a la vitronectina.
9. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.
- 35 10. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de cualquier reivindicación anterior para su uso en terapia.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente una cantidad eficaz de al menos uno de una marca detectable o informador, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, eritropoyetina, un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, un antagonista de citoquina, un radiofármaco, un modulador de receptores de estrógeno, una citotoxina, un agente anticanceroso, un agente alquilante, un antimetabolito o un inhibidor mitótico.
- 50 13. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal humano o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 55 14. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 13 que codifica el anticuerpo monoclonal humano que comprende el SEQ ID NO:7 y el SEQ ID NO:8.
- 60 15. La molécula de ácido nucleico aislado de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, donde la molécula de ácido nucleico se incorpora a un vector de expresión.
16. Una célula anfitriona que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 15.
- 65 17. Una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha célula anfitriona es una célula COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, de mieloma, de linfoma o una célula vegetal.

18. Un método para producir un anticuerpo monoclonal humano o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 16 o la reivindicación 17 en condiciones tales que se exprese el anticuerpo.

5 19. Un animal transgénico no humano o una planta que expresa el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

20. Un animal transgénico no humano de acuerdo con la reivindicación 19, donde el animal tiene un genoma que comprende un transgén o transcromosoma de la cadena pesada humana y un transgén o transcromosoma de la cadena ligera humana.

21. El uso de un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA de células B, células T o FAB, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor óseo relacionado con el cáncer, o enfermedad maligna.

22. El uso de la reivindicación 21, donde el medicamento se administra con una cantidad eficaz de al menos uno de: una marca detectable o informador, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, eritropoyetina, un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina o un antagonista de citoquina.

23. El uso de la reivindicación 21 o la reivindicación 22, donde dicho medicamento es adecuado para la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocardiaca, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmica.

24. Un medicamento combinado que comprende el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y una cantidad eficaz de al menos uno de: una marca detectable o informador, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, eritropoyetina, un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina o un antagonista de citoquina, para el uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento o la prevención de: una leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA de células B, células T o FAB, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor óseo relacionado con el cáncer, o enfermedad maligna.

25. El uso de una cantidad eficaz de al menos uno de: una marca detectable o informador, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, eritropoyetina, un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, una epinefrina o análogo, una citoquina o un antagonista de citoquina, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de: una leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA de células B, células T o FAB, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor óseo relacionado con el cáncer, o enfermedad maligna, donde el

ES 2 346 041 T3

paciente ha sido tratado previamente con al menos un anticuerpo o una de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

5 26. El uso de la reivindicación 21, donde el paciente ha sido tratado previamente con al menos un compuesto o proteína seleccionados entre al menos uno de; una marca detectable o informado, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, eritropoyetina, un agente inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un medicamento de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina o un antagonista de citoquina.

10 27. Un artículo de manufactura, que comprende material de embalaje y un recipiente que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

20 28. El artículo de manufactura de la reivindicación 27, donde dicho recipiente es un componente de un dispositivo o sistema de liberación parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocardiaca, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmica.

25 29. Un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo humano aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar dicho al menos un anticuerpo anti-subunidad alfa-V de al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraosteal, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmico.

30 30. Un método que comprende hacer crecer el animal o planta transgénicos de la reivindicación 19, que produce el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

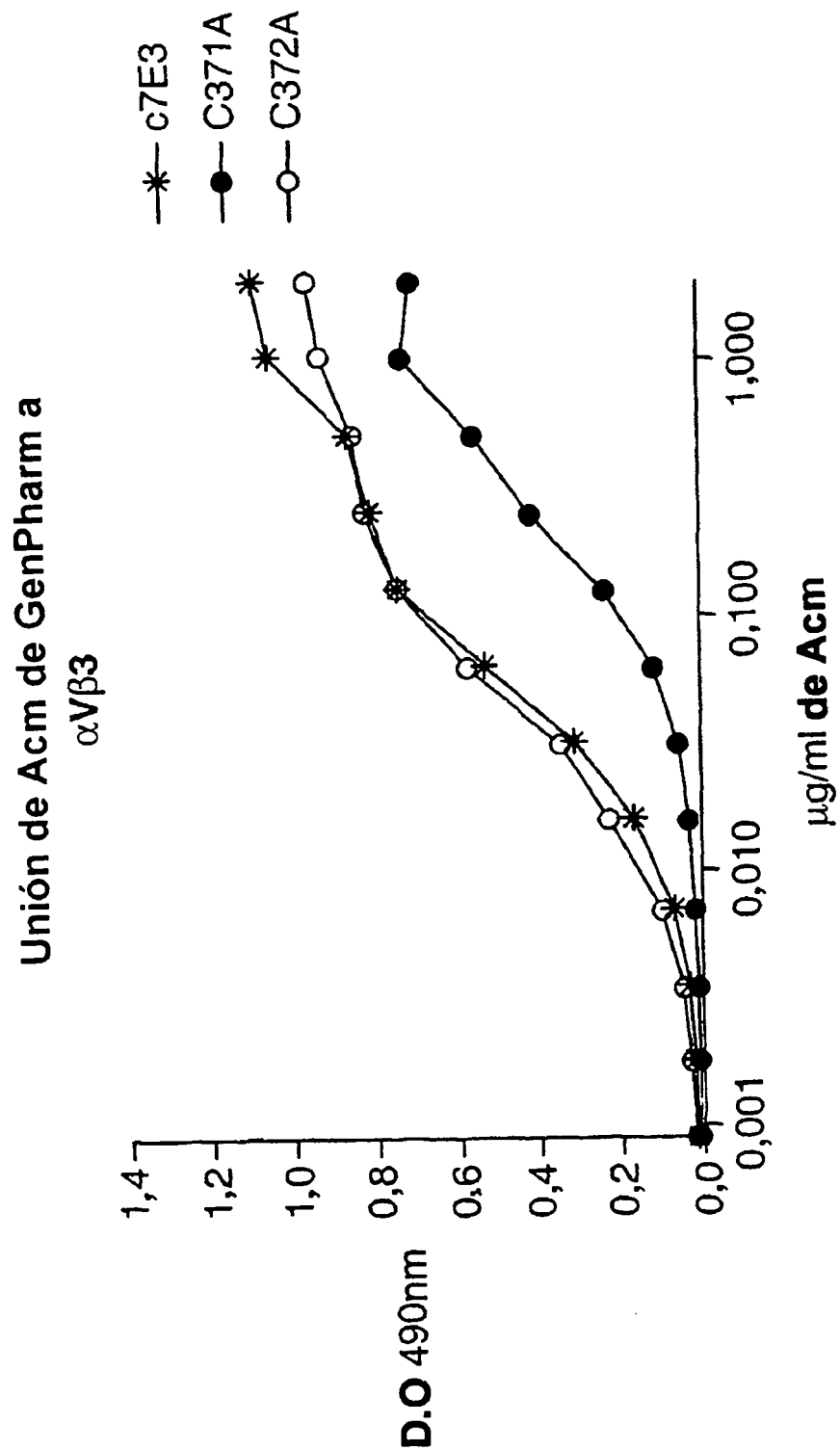


FIG. 2

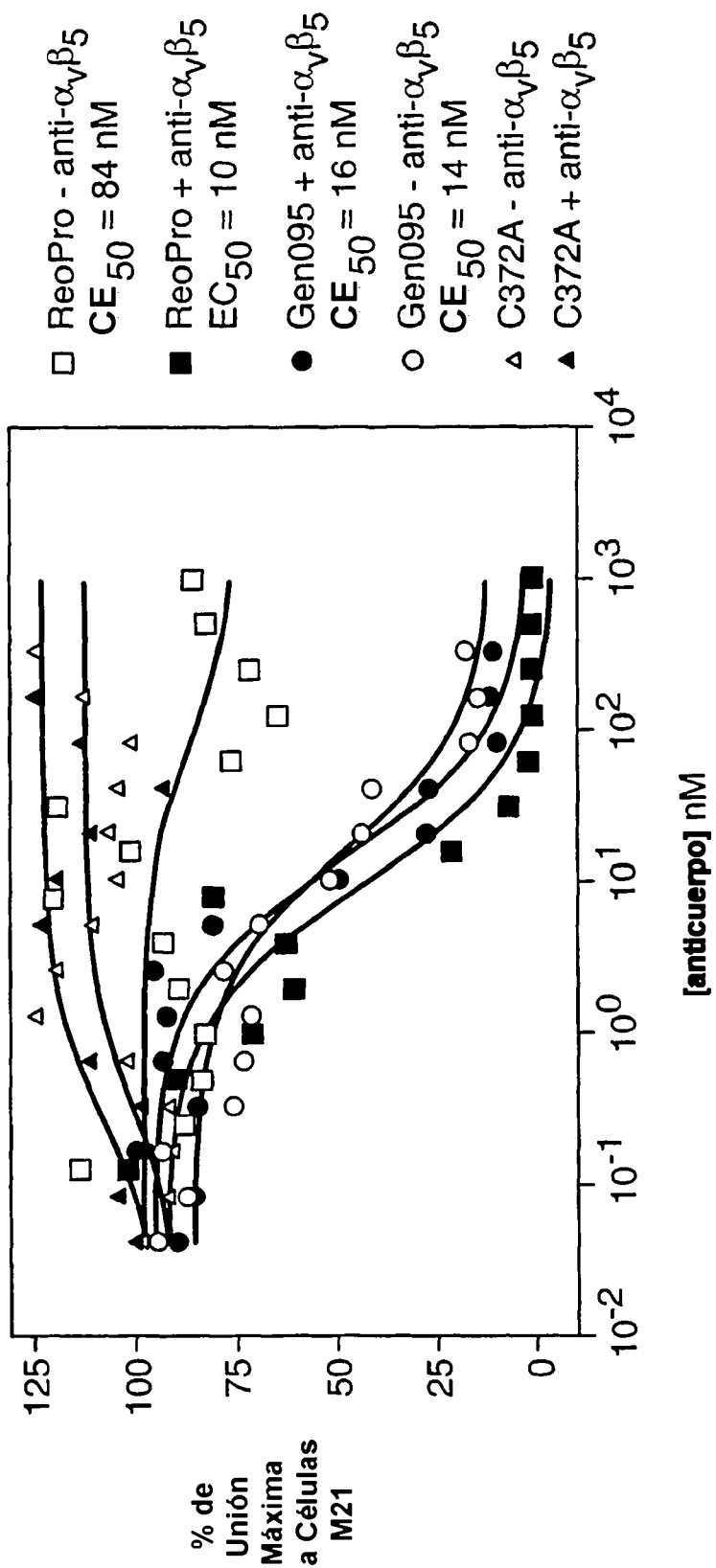


FIG. 3

**Adherencia de Células
MDAMB435L2 de Carcinoma
de Mama Humano a Vitronectina**

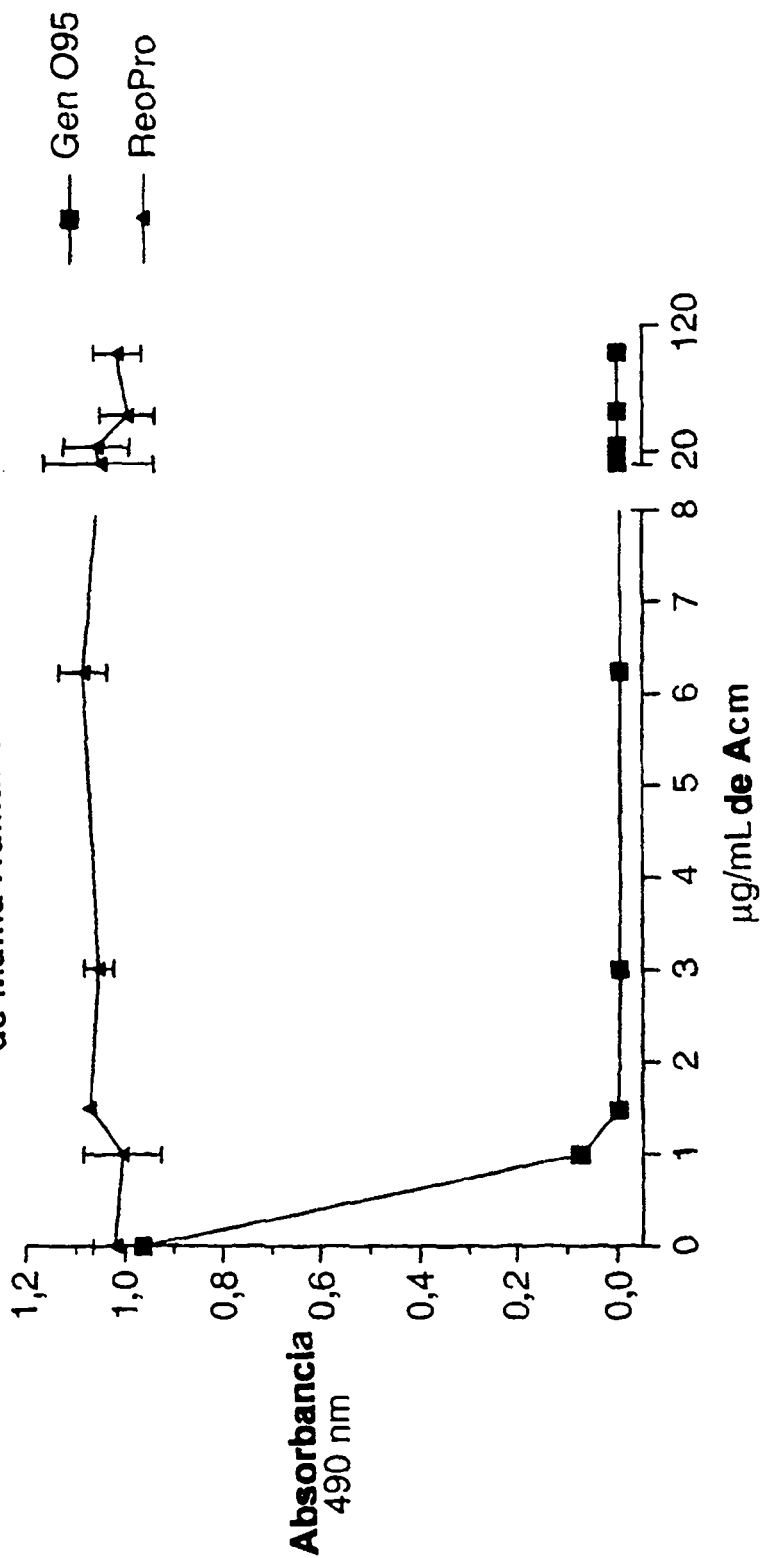


FIG. 4A

Unión de $\alpha V\beta 3$ a Placa con GenO95 en presencia de EDTA 50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

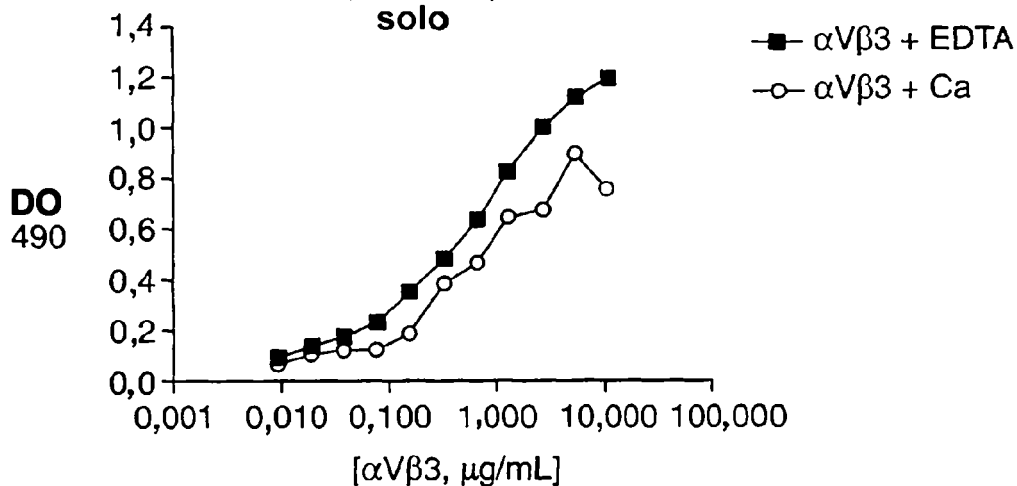


FIG. 4B

Unión de $\alpha V\beta 3$ a Placa con C372A en presencia de EDTA 50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

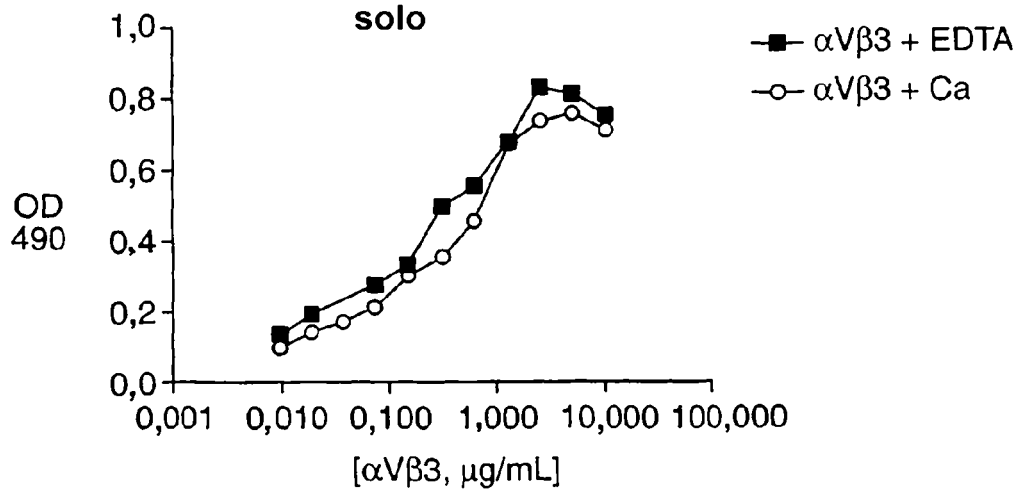


FIG. 4C

Unión de $\alpha V\beta 3$ a Placa con IgG
c7E3 en presencia de EDTA
50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

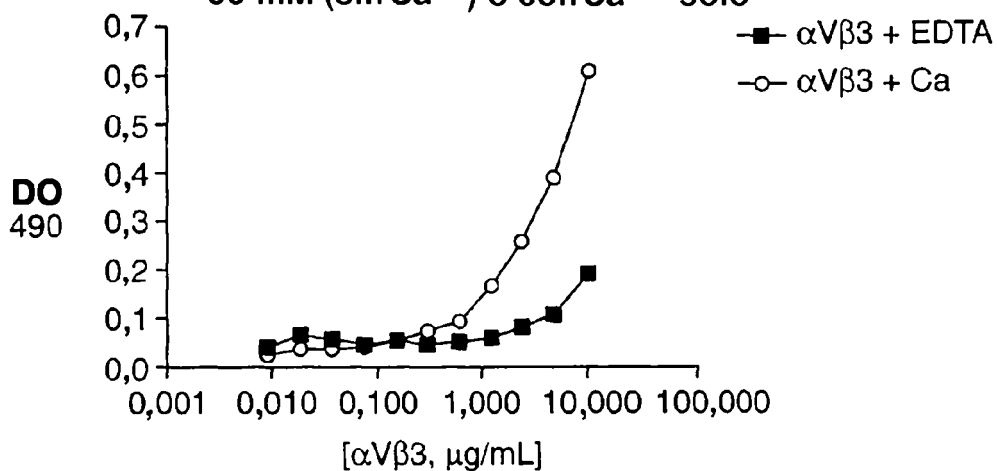


FIG. 4D

Unión de $\alpha V\beta 3$ a Placa con IgG
LM609 en presencia de EDTA
50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

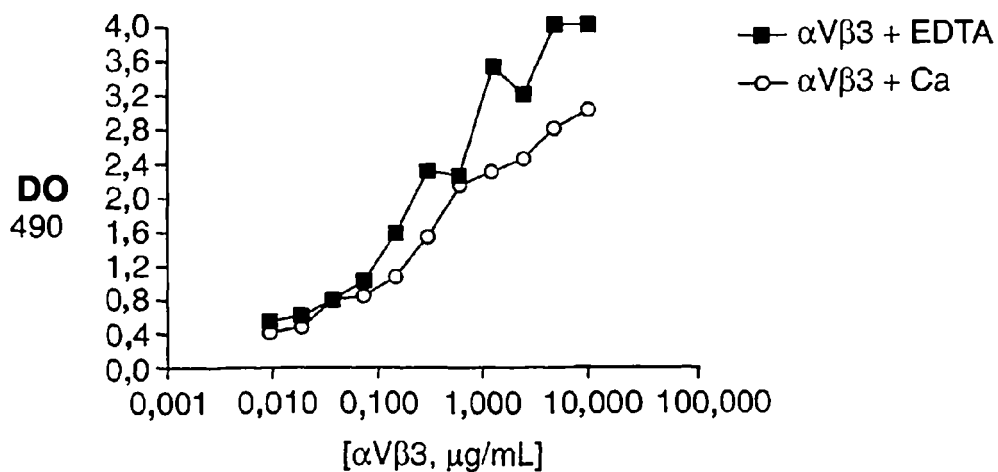


FIG. 4E

Unión de $\alpha V\beta 5$ a Placa con IgG
GenO95 en presencia de EDTA
50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

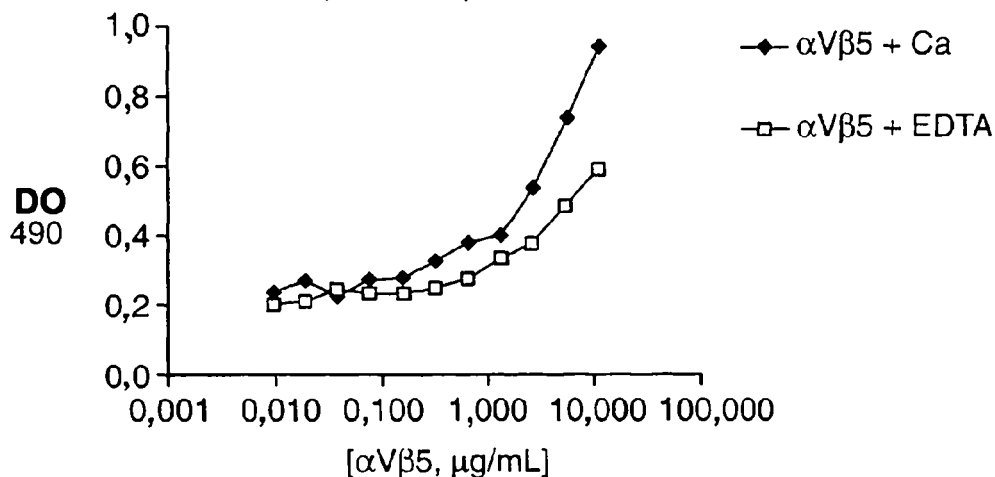


FIG. 4F

Unión de $\alpha V\beta 5$ a Placa con IgG
C372 en presencia de EDTA
50 mM (sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

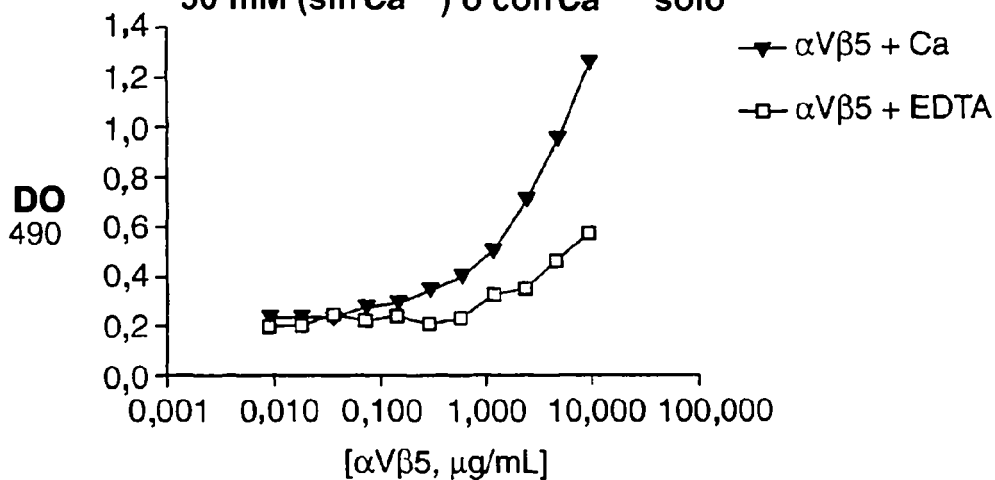


FIG. 4G

Unión de $\alpha V\beta 5$ a Placa con IgG
cE73 en presencia de EDTA 50 mM
(sin Ca^{++}) o con Ca^{++} solo

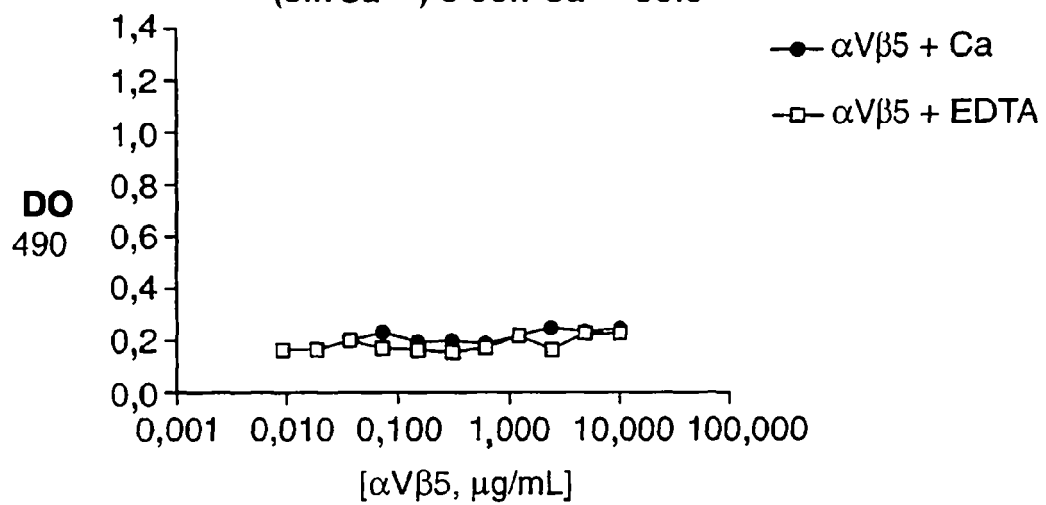


FIG. 5A

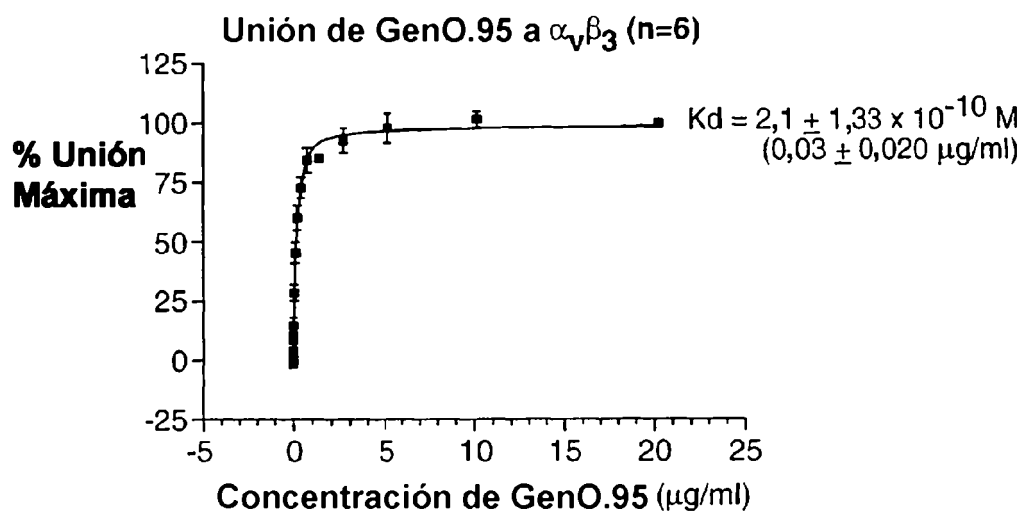


FIG. 5B

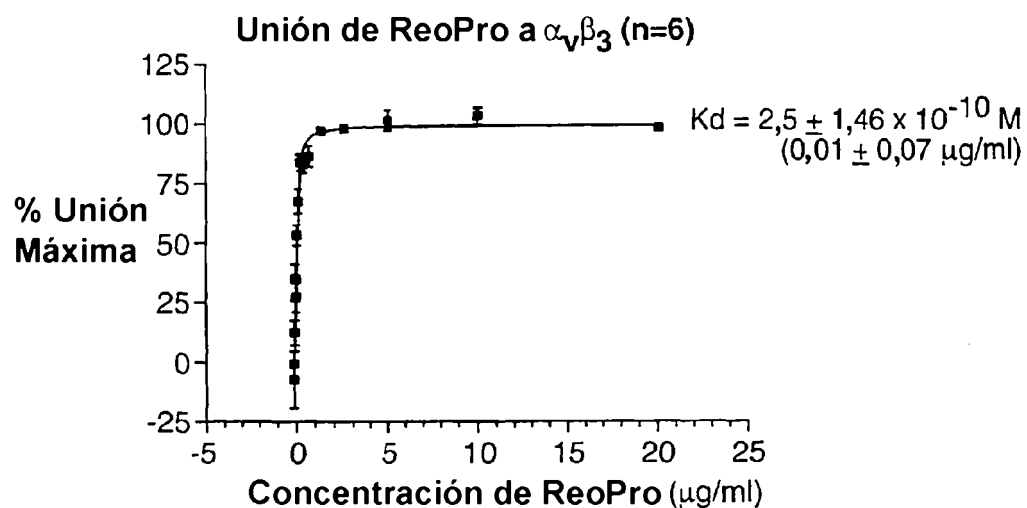


FIG. 6A

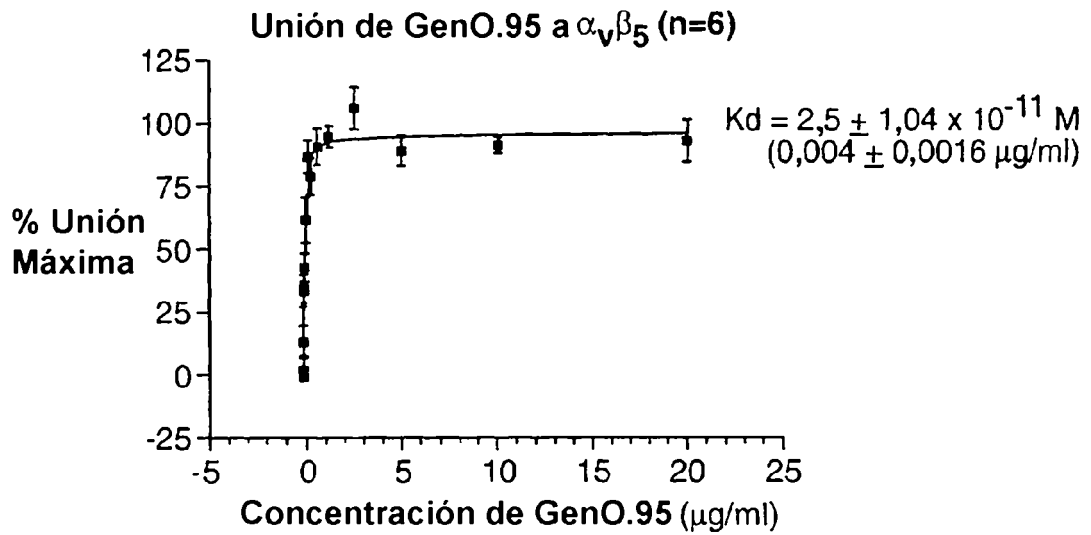


FIG. 6B

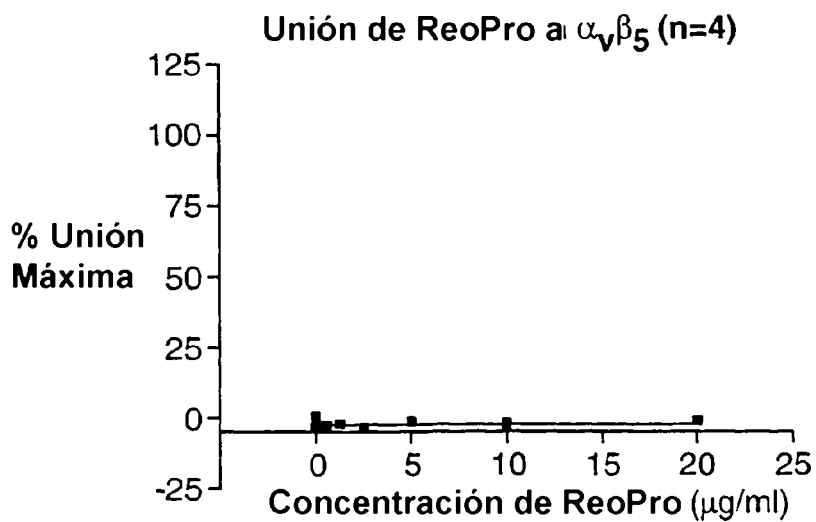


FIG. 7A

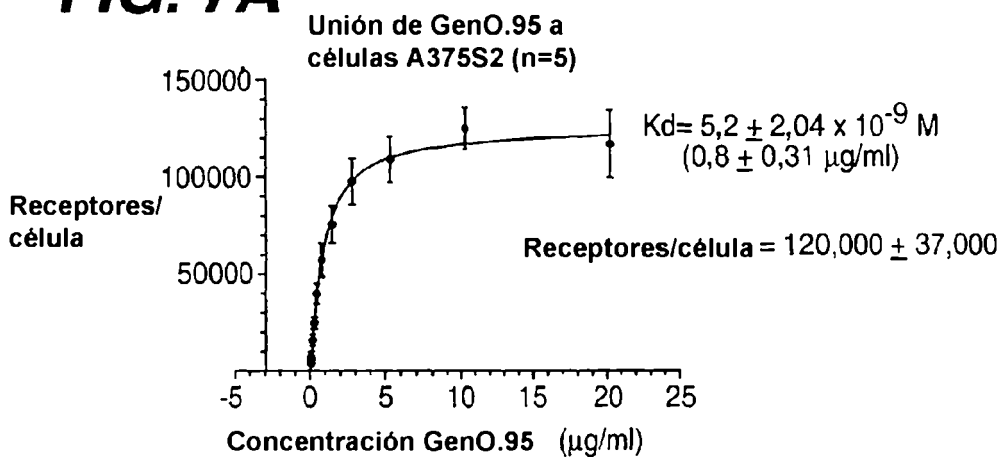


FIG. 7B

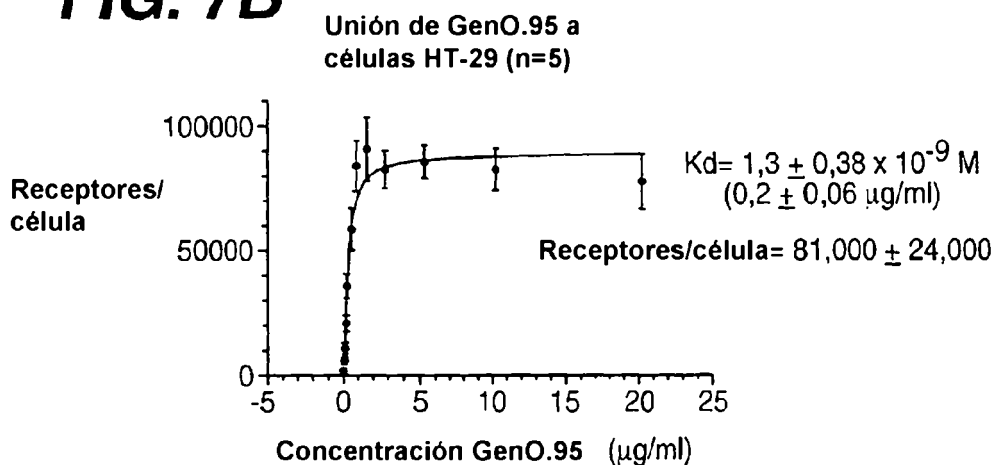


FIG. 7C

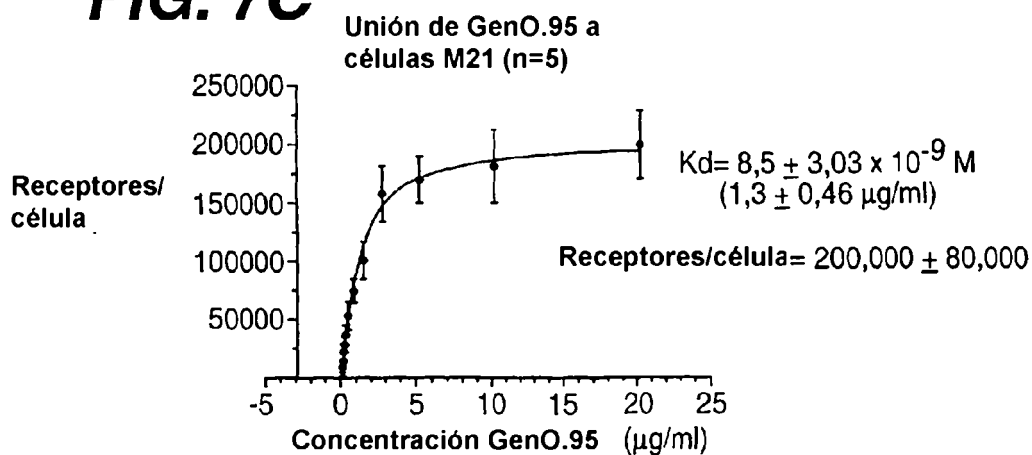


FIG. 8A

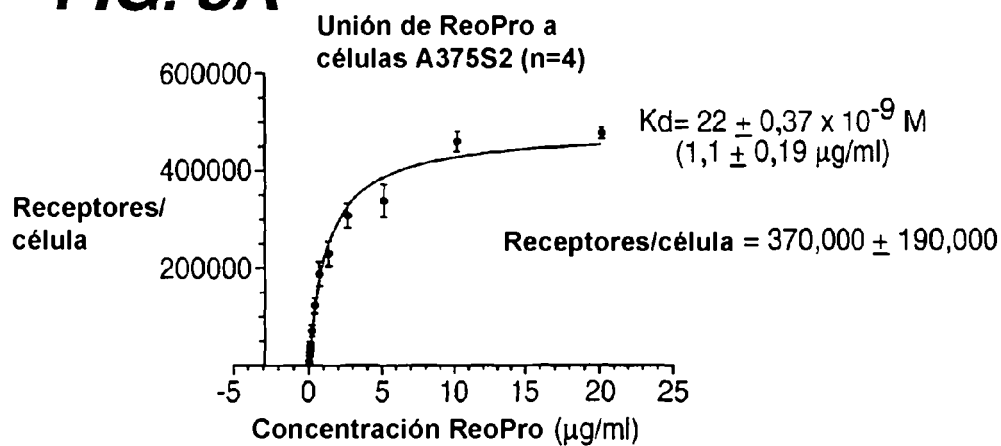


FIG. 8B

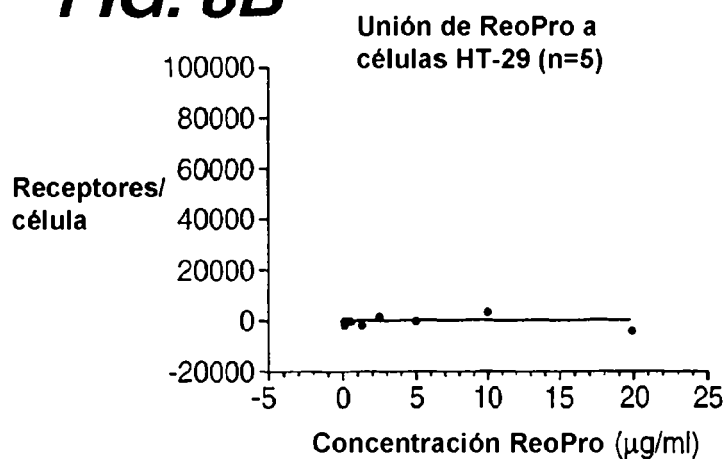


FIG. 8C

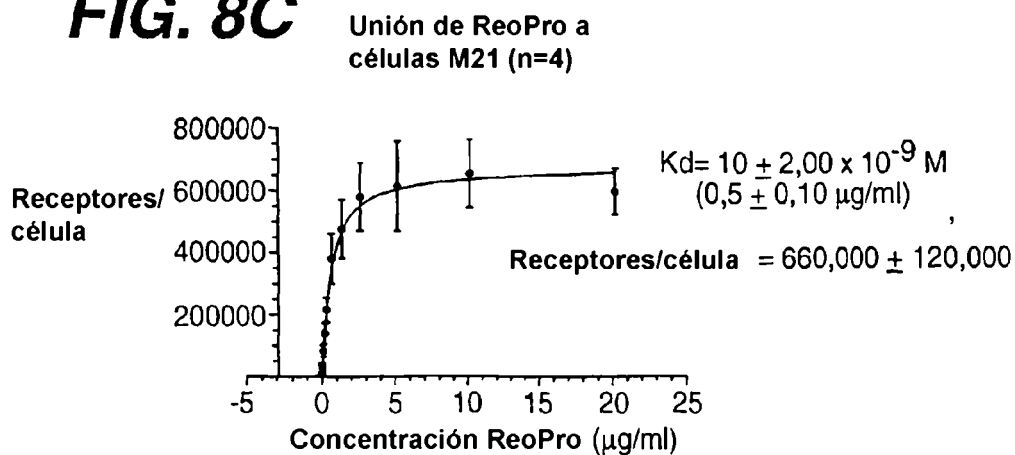


FIG. 9

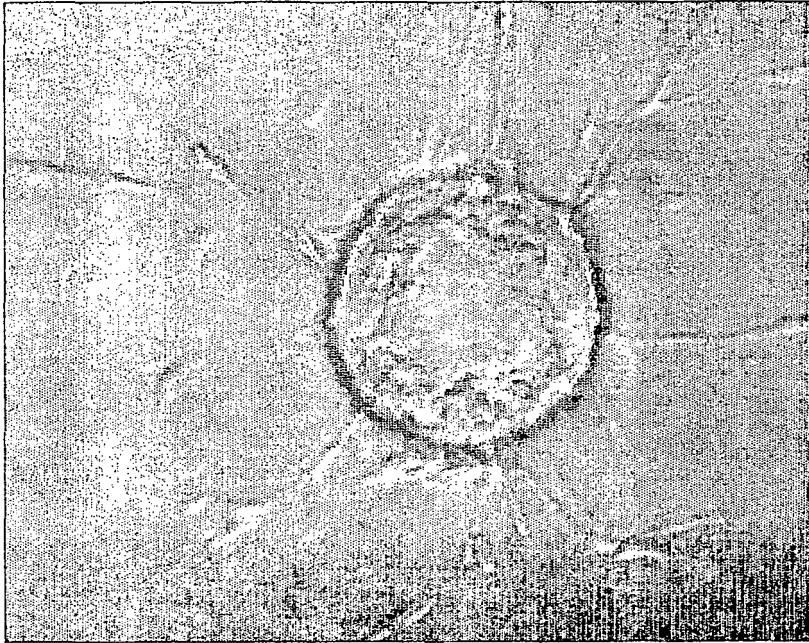


FIG. 10

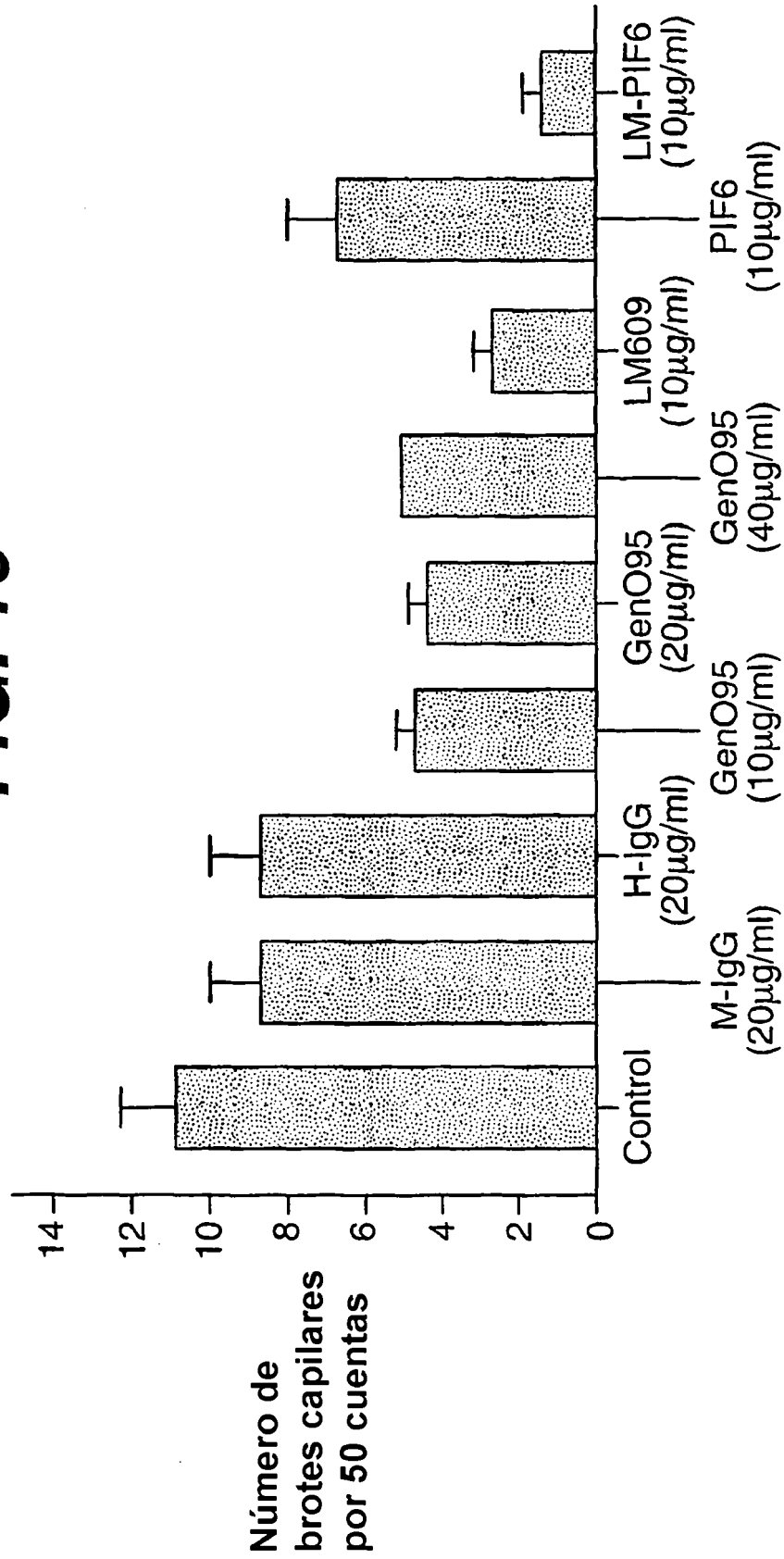


FIG. 11

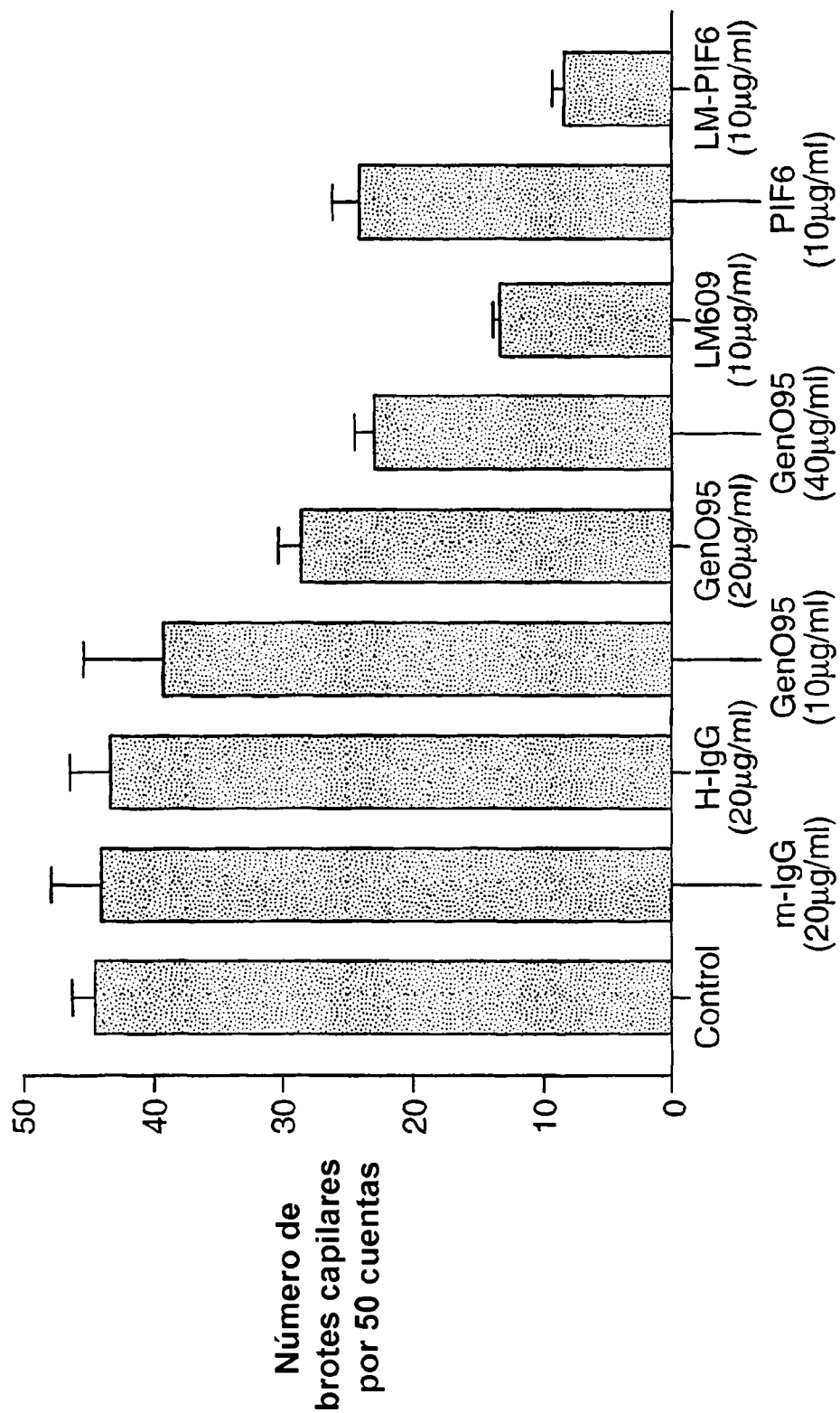


FIG. 12A

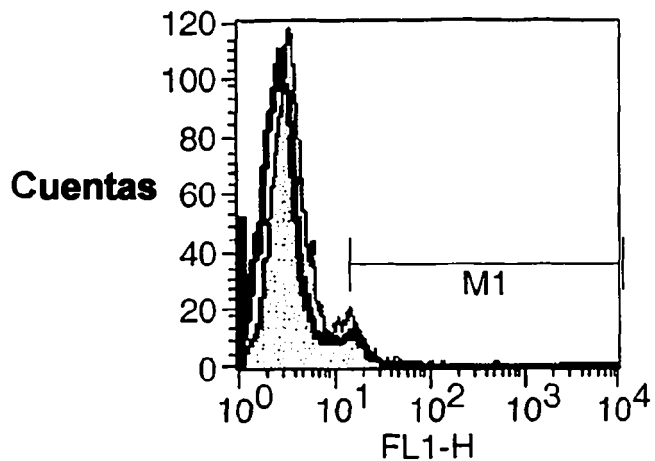


FIG. 12B

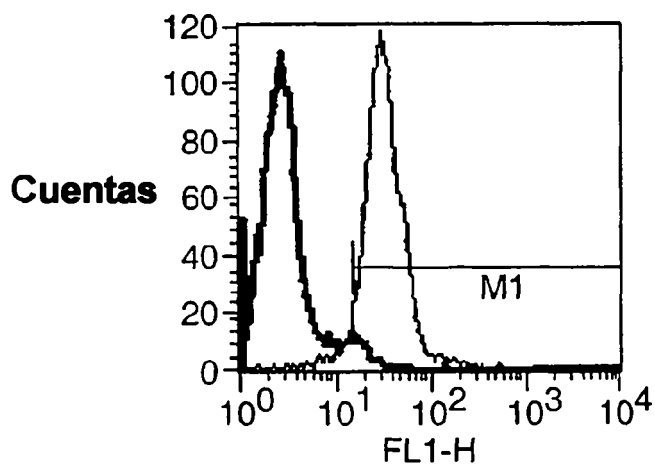


FIG. 12C

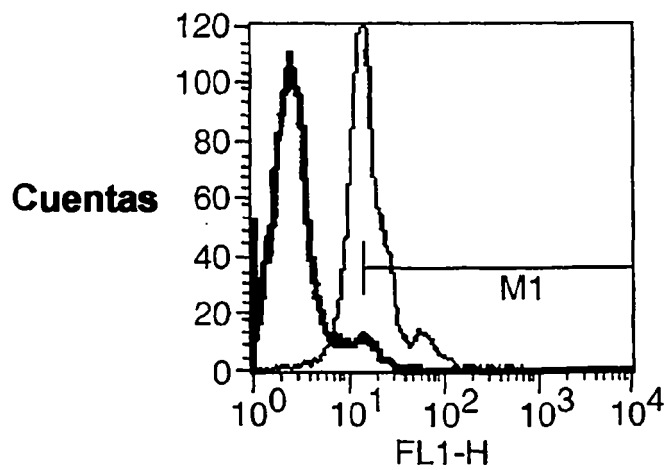


FIG. 12D

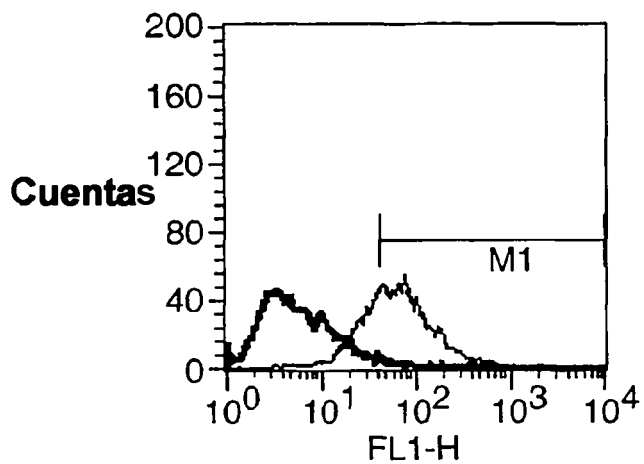


FIG. 12E

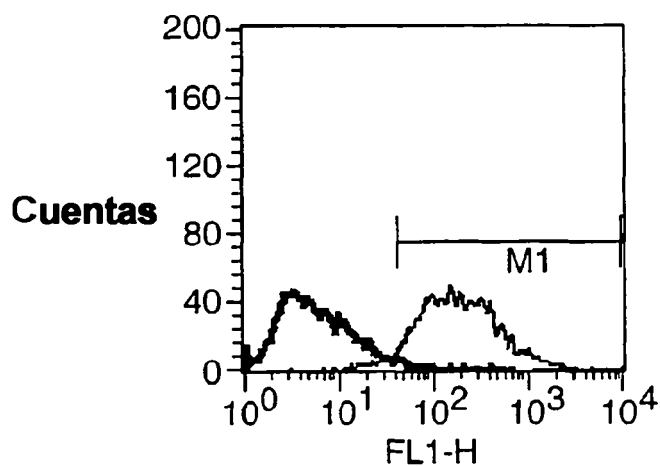


FIG. 12F

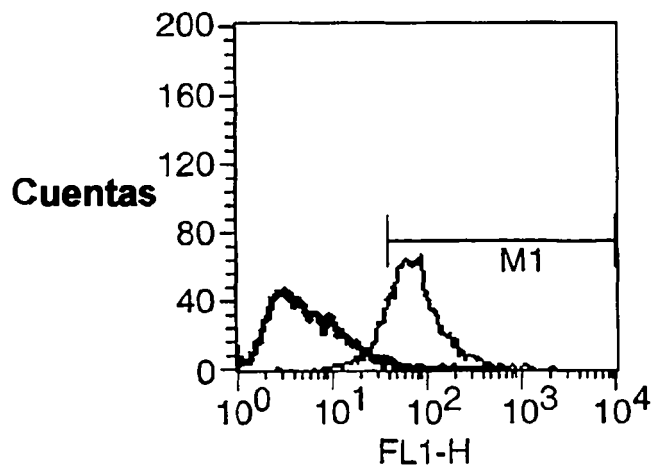


FIG. 12G

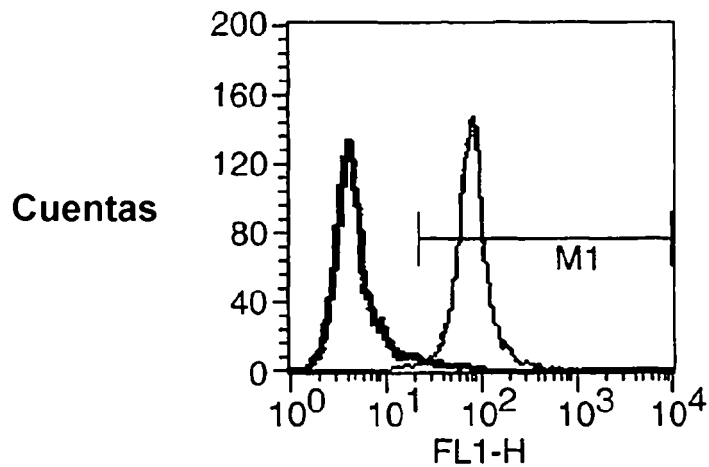


FIG. 12H

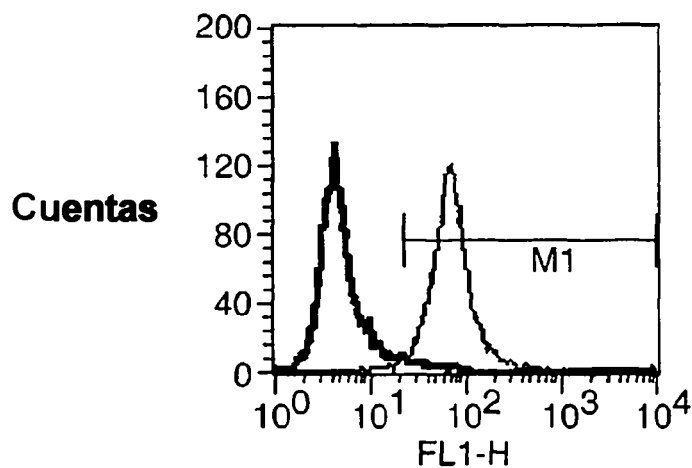


FIG. 12 I

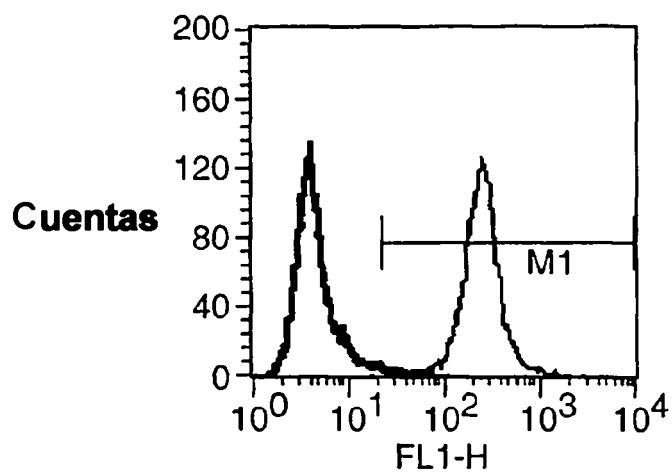


FIG. 13

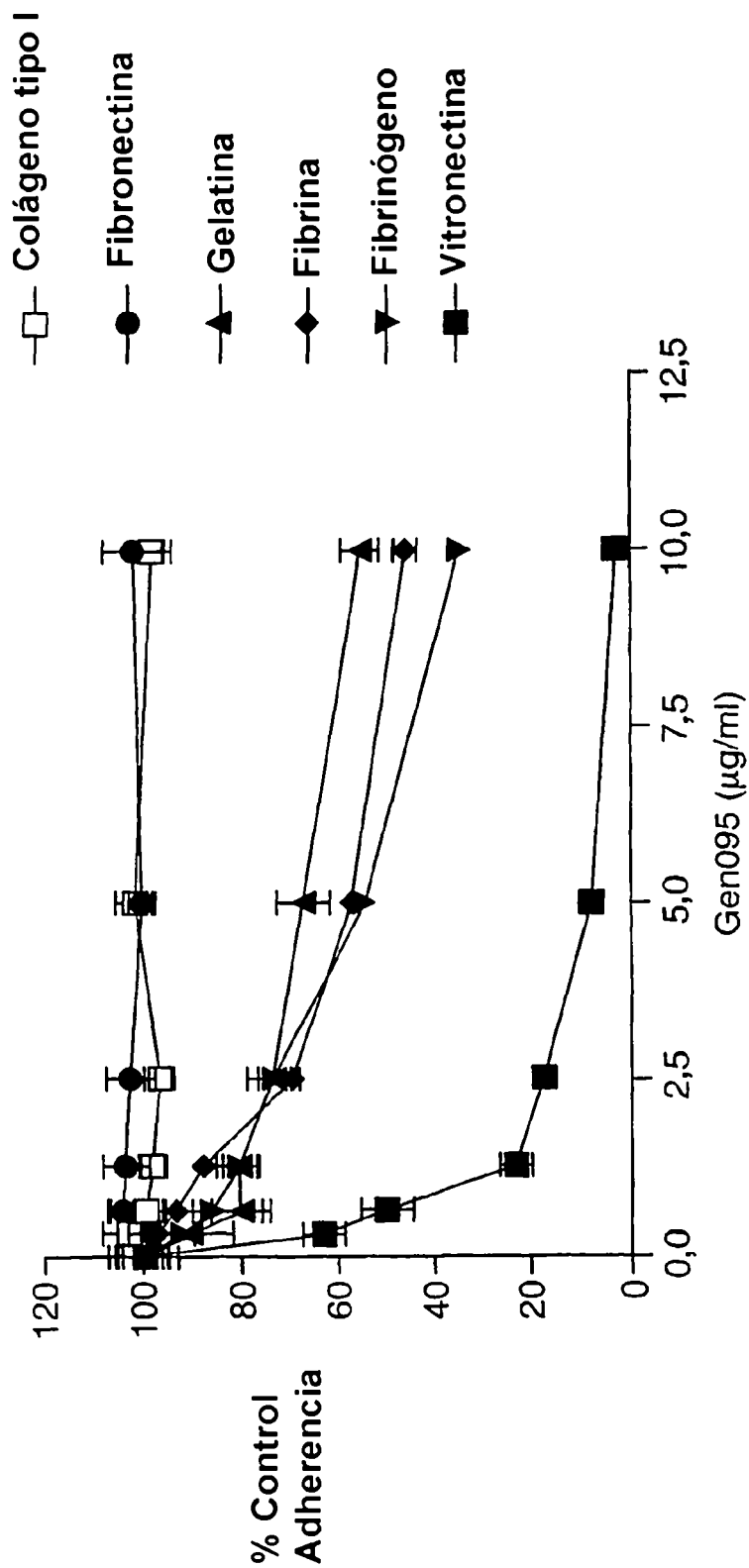


FIG. 14

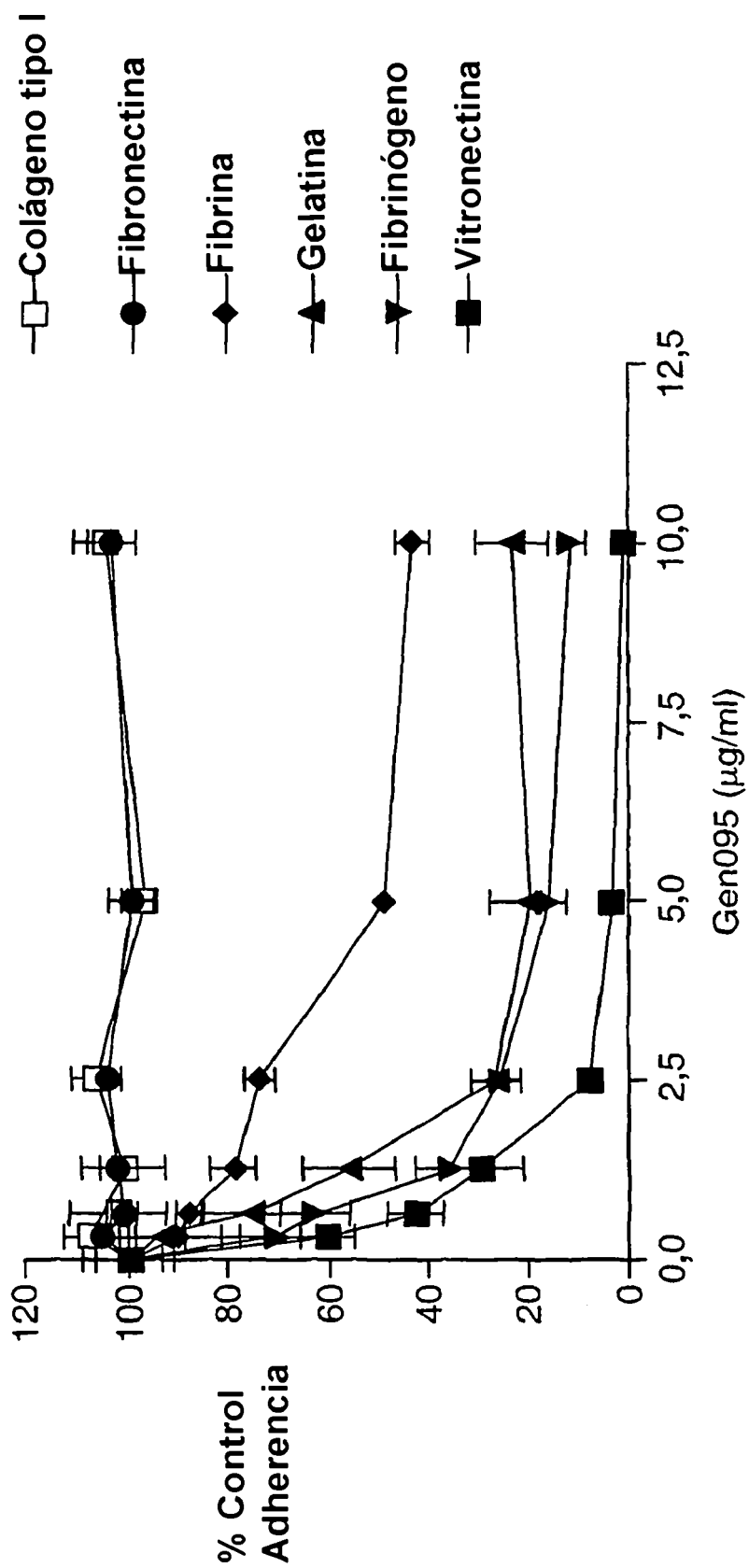


FIG. 15

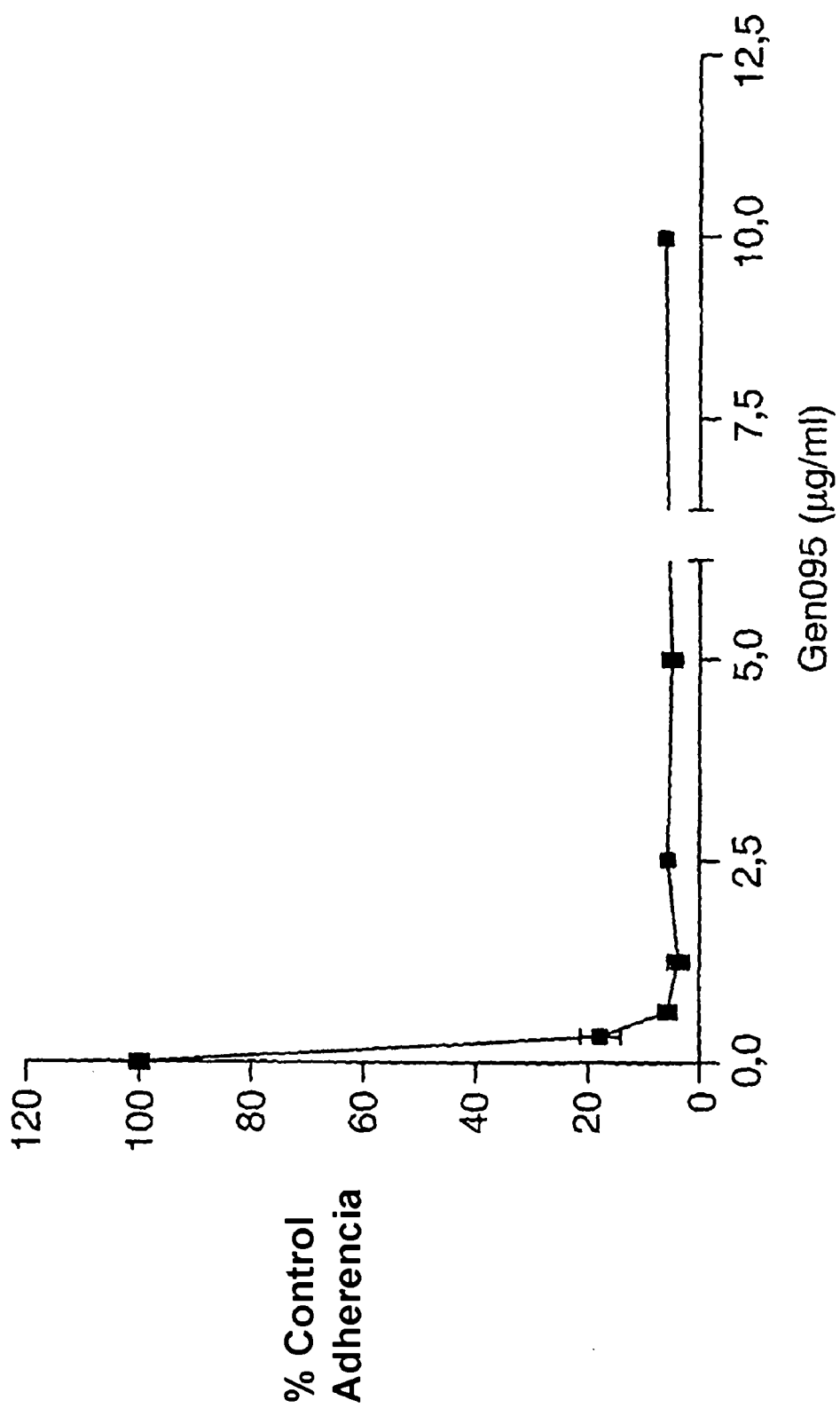


FIG. 16A **FIG. 16B** **FIG. 16C**

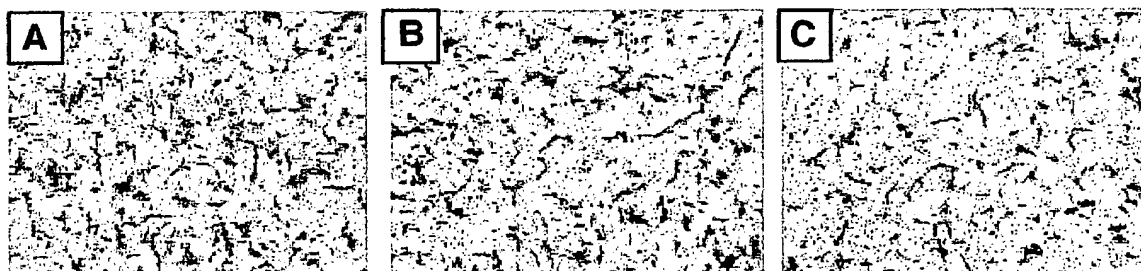


FIG. 16D

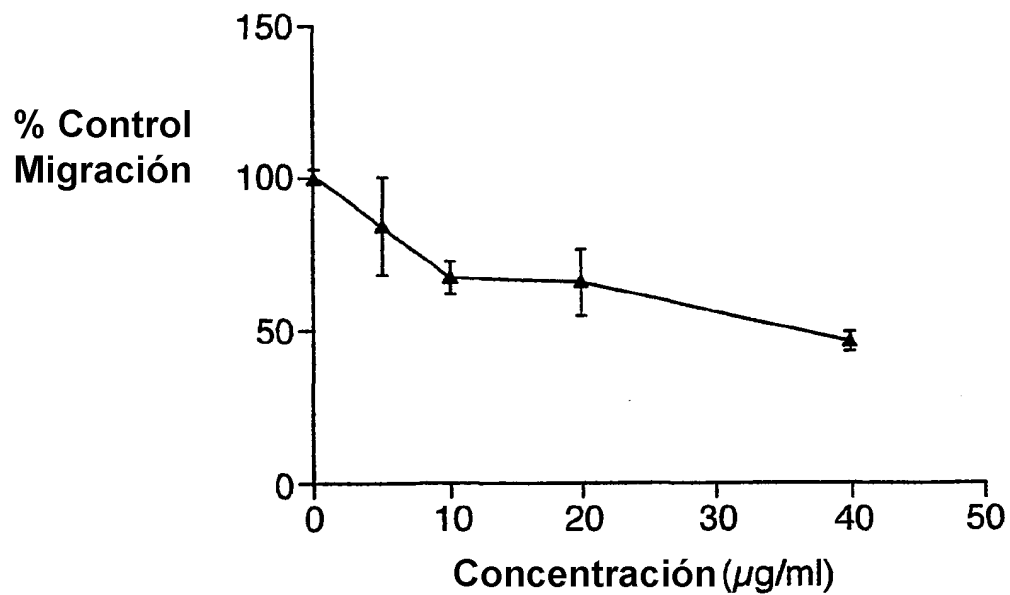


FIG. 17

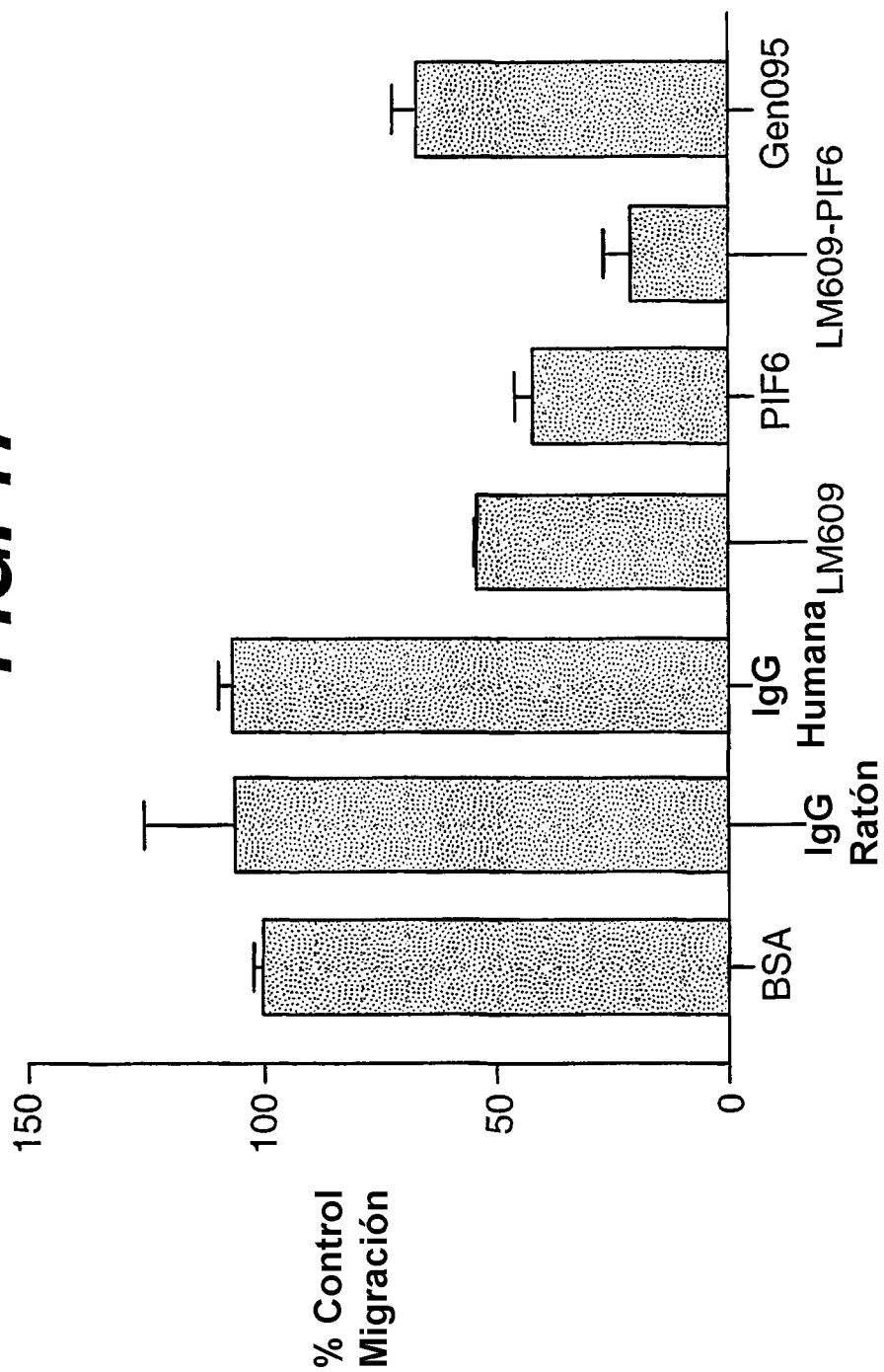


FIG. 18A

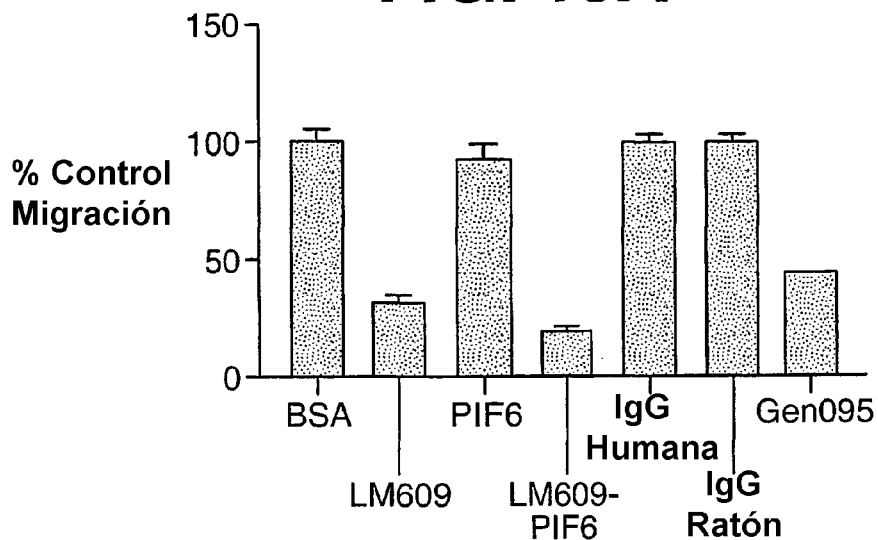


FIG. 18B

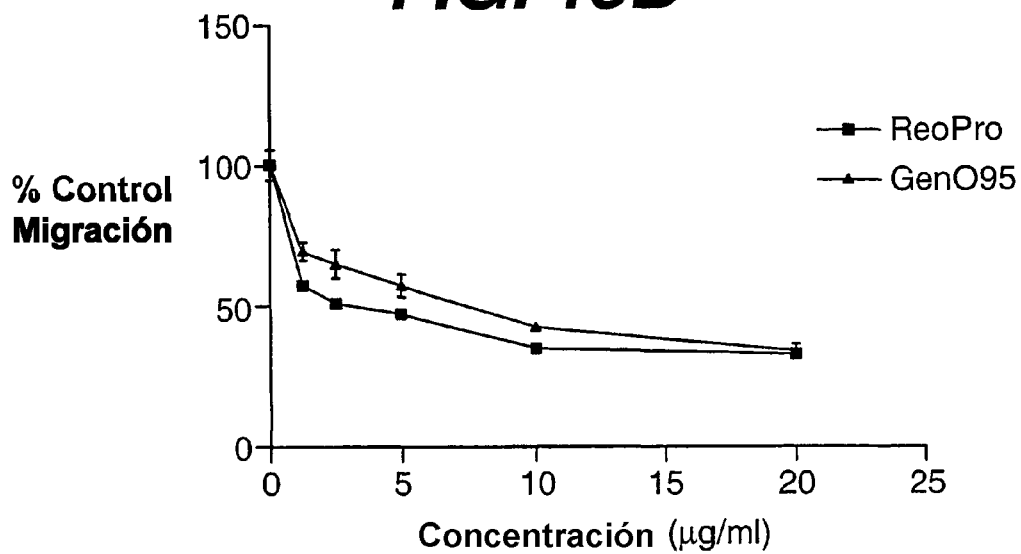


FIG. 18C



FIG. 18D

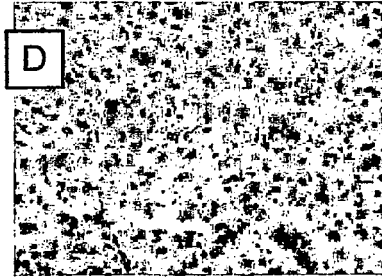


FIG. 18E

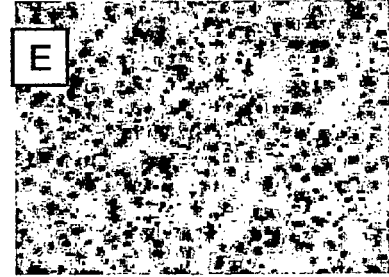


FIG. 19A

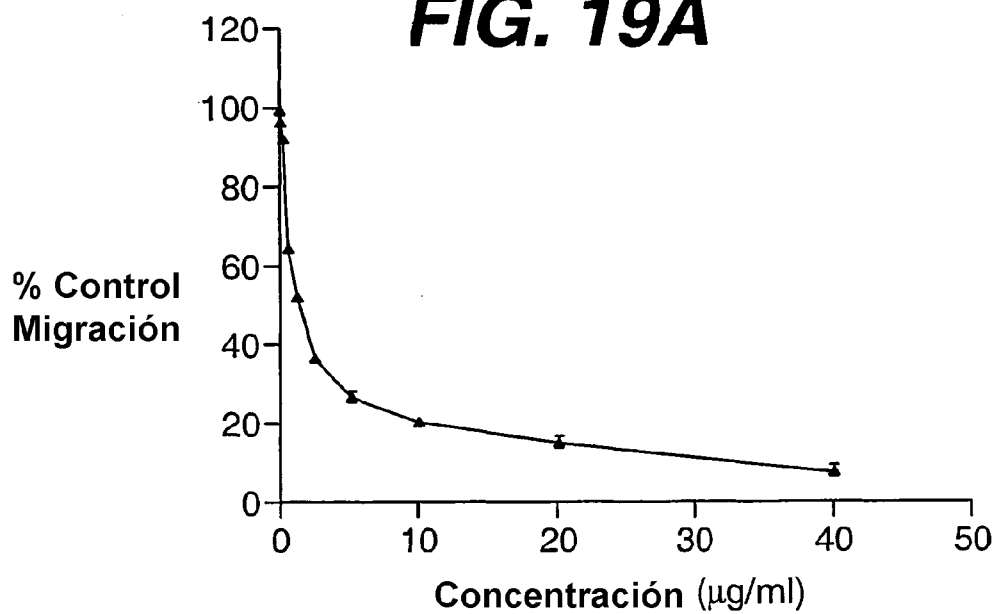


FIG. 19B

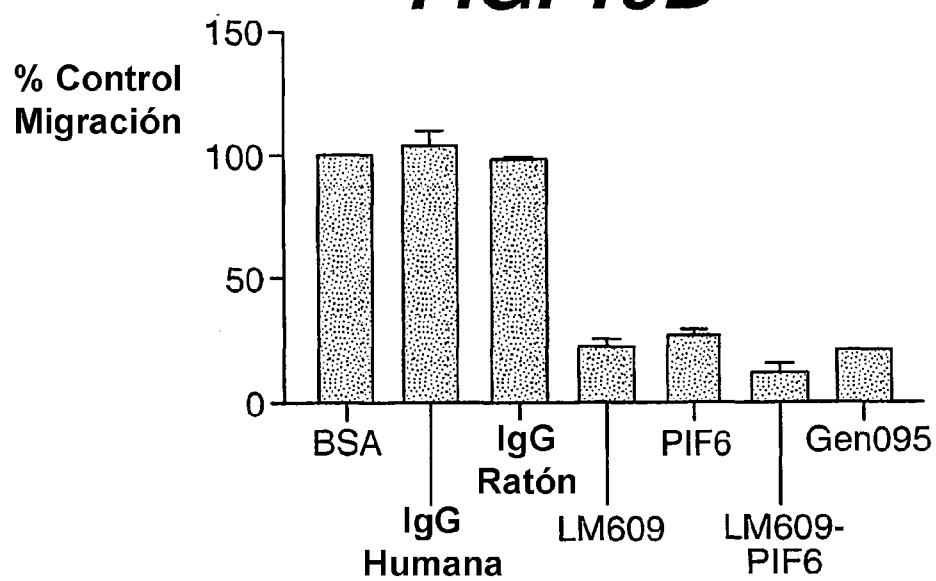


FIG. 19C



FIG. 19D

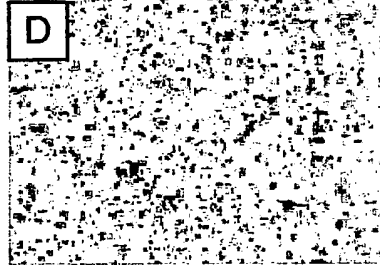


FIG. 19E

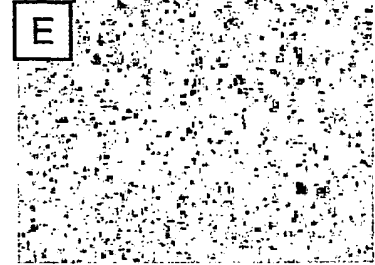


FIG. 20D

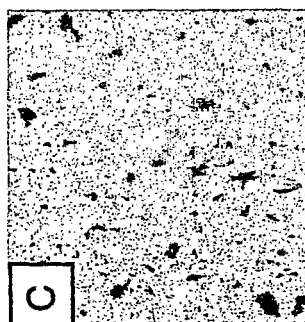
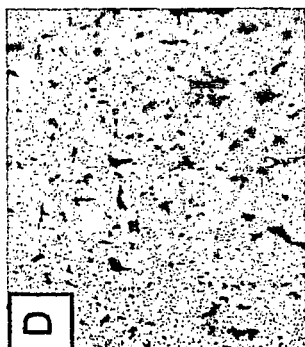


FIG. 20C

FIG. 20B

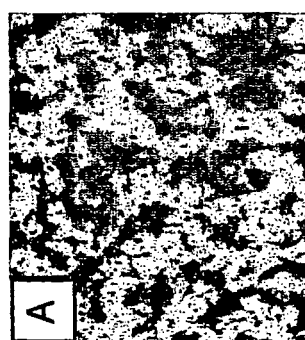
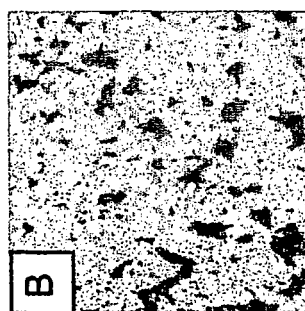


FIG. 20A

FIG. 20E

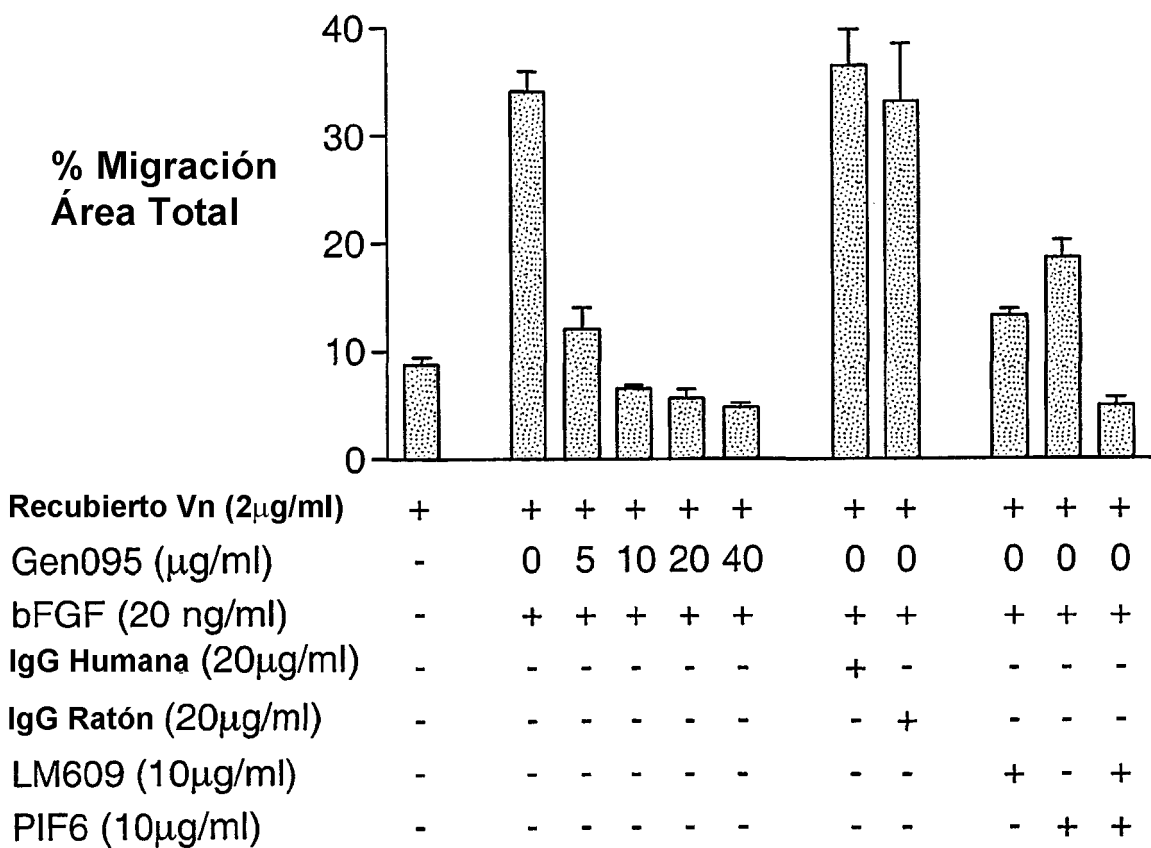


FIG. 21A



FIG. 21B

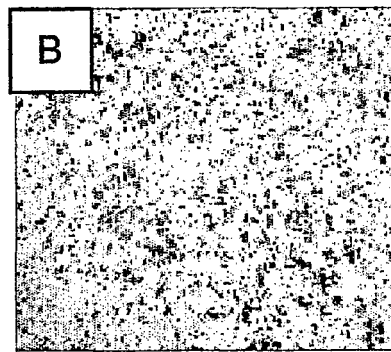


FIG. 21C

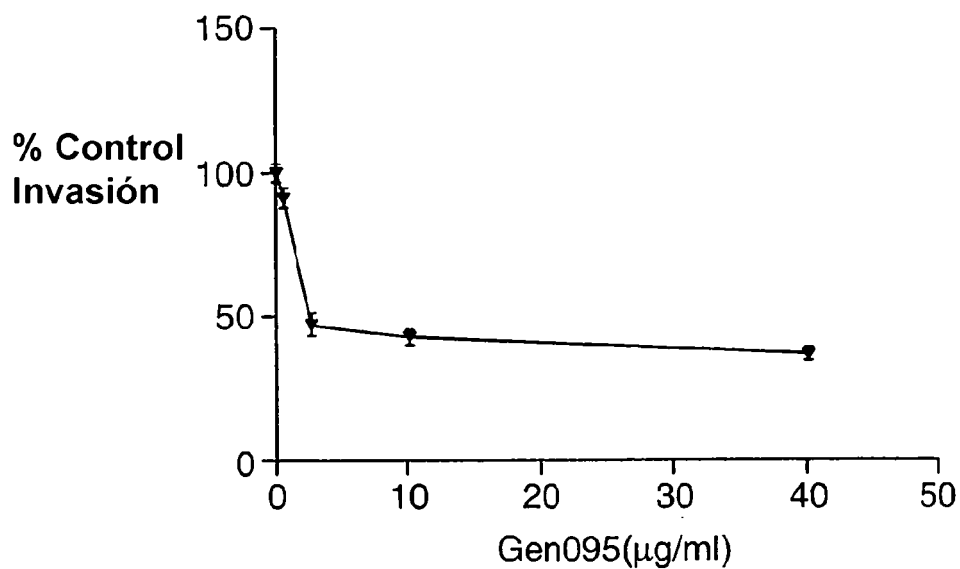
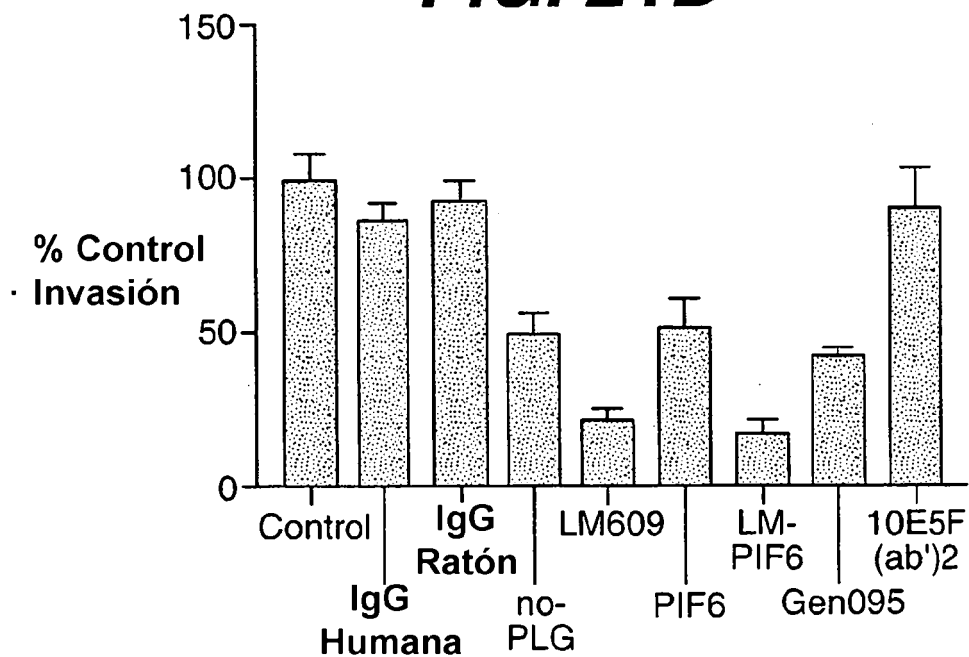


FIG. 21D



ES 2 346 041 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Giles-Komar, Jill; Heavner, George; Snyder, Linda; Trikha, Mohit

5 <120> ANTICUERPOS PARA INTEGRINAS DUALES, COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS

<130> CEN 249

<160> 17

<170> PatentIn Ver 2.0

10

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

20

Arg Tyr Thr Met His
5

<210> 2

25

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 2

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

35

<210> 3

<211> 10

40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

45

Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

50

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

65

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 346 041 T3

<400> 5

5 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 7

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

15 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 346 041 T3

<400> 8

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

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

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

 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

20 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

25 <210> 9
 <211> 1048
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

35 Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
 1 5 10 15

 Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
 20 25 30

40 Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
 35 40 45

 Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
 50 55 60

45 Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
 65 70 75 80

50 Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
 85 90 95

 Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
 100 105 110

55 Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
 115 120 125

 Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
 130 135 140

60 Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
 145 150 155 160

65 Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
 165 170 175

ES 2 346 041 T3

Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190

5 Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205

Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220

10 Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val
 245 250 255

15 Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly
 260 265 270

20 Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly
 275 280 285

Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala
 290 295 300

25 Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr
 305 310 315 320

Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp
 325 330 335

30 Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala
 340 345 350

35 Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala
 355 360 365

Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly
 370 375 380

40 Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys
 385 390 395 400

Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val
 405 410 415

45 Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro
 420 425 430

Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly
 435 440 445

Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu
 450 455 460

55 Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
 465 470 475 480

Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
 485 490 495

65

ES 2 346 041 T3

	Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp	500	505	510
5	Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu	515	520	525
	Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu	530	535	540
10	Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly	545	550	555
	Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser	565	570	575
15	Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg	580	585	590
	Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu	595	600	605
20	Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu	610	615	620
	Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val	625	630	635
25	Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr	645	650	655
30	Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu	660	665	670
	Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg	675	680	685
35	Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn	690	695	700
	Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly	705	710	715
40	Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu	725	730	735
	Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu	740	745	750
45	Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val	755	760	765
	Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe	770	775	780
50	Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu	785	790	795
	Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly	805	810	815
55				
60				
65				

ES 2 346 041 T3

Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys
 820 825 830
 Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly
 835 840 845
 Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys
 850 855 860
 Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln
 865 870 875 880
 Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu
 885 890 895
 Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
 900 905 910
 Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln
 930 935 940
 Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
 945 950 955 960
 Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
 965 970 975
 Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
 980 985 990
 Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 995 1000 1005
 Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg Val
 1010 1015 1020
 Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro His Glu
 1025 1030 1035 1040
 Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
 1045

45 <210> 10
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

55 agatatacta tgcac

15

60 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 346 041 T3

<400> 11

5 gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact 51
ccgtgaaggg c

<210> 12

10 <211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 12

gaggcccggg gatcgtatgc ttttgatatc 30

20 <210> 13

<211> 33

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

30 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cc 33

<210> 14

35 <211> 18

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 14

gatgcatcca acagggcc 18

45 <210> 15

<211> 21

<212> ADN

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

55 cagcagcgta gcaactggcc t 21

<210> 16

60 <211> 788

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 346 041 T3

<400> 16

5 Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Ala Thr Val Leu Ala
1 5 10 15
Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30
10 Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45
Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60
15 Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80
Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
85 90 95
20 Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
100 105 110
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
115 120 125
25 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
130 135 140
30 Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
145 150 155 160
Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg
165 170 175
35 Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr
180 185 190
40 Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr
195 200 205

45

50

55

60

65

ES 2 346 041 T3

	Thr	Cys	Leu	Pro	Met	Phe	Gly	Tyr	Lys	His	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp
	210						215					220				
5	Gln	Val	Thr	Arg	Phe	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Gln	Ser	Val	Ser	Arg
	225					230					235					240
	Asn	Arg	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Gln	Ala	Thr
					245					250					255	
10	Val	Cys	Asp	Glu	Lys	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Asp	Ala	Ser	His	Leu	Leu
				260					265					270		
	Val	Phe	Thr	Thr	Asp	Ala	Lys	Thr	His	Ile	Ala	Leu	Asp	Gly	Arg	Leu
			275					280						285		
15	Ala	Gly	Ile	Val	Gln	Pro	Asn	Asp	Gly	Gln	Cys	His	Val	Gly	Ser	Asp
		290					295						300			
	Asn	His	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Met	Asp	Tyr	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu
20	305					310					315					320
	Met	Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gln	Lys	Asn	Ile	Asn	Leu	Ile	Phe	Ala	Val
					325					330					335	
	Thr	Glu	Asn	Val	Val	Asn	Leu	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Ser	Glu	Leu	Ile	Pro
25				340					345					350		
	Gly	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Met	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	Gln
			355					360						365		
	Leu	Ile	Val	Asp	Ala	Tyr	Gly	Lys	Ile	Arg	Ser	Lys	Val	Glu	Leu	Glu
30			370				375					380				
	Val	Arg	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Phe	Asn	Ala	Thr	Cys
	385					390					395					400
	Leu	Asn	Asn	Glu	Val	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Ser	Cys	Met	Gly	Leu	Lys
35					405					410					415	
	Ile	Gly	Asp	Thr	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys
			420						425					430		
40	Pro	Gln	Clu	Lys	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys
			435					440					445			
	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Cys	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln
45			450				455						460			
	Ala	Gln	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr
	465					470						475				480
	Phe	Glu	Cys	Gly	Val	Cys	Arg	Cys	Gly	Pro	Gly	Trp	Leu	Gly	Ser	Gln
50					485					490					495	
	Cys	Glu	Cys	Ser	Glu	Glu	Asp	Tyr	Arg	Pro	Ser	Gln	Gln	Asp	Glu	Cys
				500					505					510		
	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Gln	Pro	Val	Cys	Ser	Gln	Arg	Gly	Glu	Cys	Leu
55			515					520						525		

60

65

ES 2 346 041 T3

Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly
 530 535 540
 5 Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu
 545 550 555 560
 Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp
 565 570 575
 10 Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr
 580 585 590
 Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu
 595 600 605
 15 Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys
 610 615 620
 Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
 20 625 630 635 640
 Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Glu Pro Tyr Met Thr Glu Asn Thr
 645 650 655
 25 Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
 660 665 670
 Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
 675 680 685
 30 Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
 690 695 700
 Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
 705 710 715 720
 35 Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
 40 740 745 750
 Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
 755 760 765
 45 Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr
 770 775 780
 Tyr Arg Gly Thr
 785

50
 <210> 17
 <211> 799
 <212> PRT
 55 <213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 346 041 T3

<400> 17

Met Pro Arg Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Ala Cys Leu Leu Gly Leu Cys
 1 5 10 15
 5 Ala Leu Leu Pro Arg Leu Ala Gly Leu Asn Ile Cys Thr Ser Gly Ser
 20 25 30
 10 Ala Thr Ser Cys Glu Glu Cys Leu Leu Ile His Pro Lys Cys Ala Trp
 35 40 45
 Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly Ser Pro Arg Ser Ile Thr Ser Arg Cys
 50 55 60
 15 Asp Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Gly Cys Gly Gly Glu Ile Glu
 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Ser Ser Phe His Val Leu Arg Ser Leu Pro Leu Ser Ser
 85 90 95
 20 Lys Gly Ser Gly Ser Ala Gly Trp Asp Val Ile Gln Met Thr Pro Gln
 100 105 110
 Glu Ile Ala Val Asn Leu Arg Pro Gly Asp Lys Thr Thr Phe Gln Leu
 115 120 125
 25 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Leu Ser Met Lys Asp Asp Leu Asp Asn Ile Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 30 Gly Thr Lys Leu Ala Glu Glu Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Phe Arg
 165 170 175
 Leu Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Asp Ile Ser Pro Phe Ser Tyr
 180 185 190
 35 Thr Ala Pro Arg Tyr Gln Thr Asn Pro Cys Ile Gly Tyr Lys Leu Phe
 195 200 205
 40 Pro Asn Cys Val Pro Ser Phe Gly Phe Arg His Leu Leu Pro Leu Thr
 210 215 220
 Asp Arg Val Asp Ser Phe Asn Glu Glu Val Arg Lys Gln Arg Val Ser
 225 230 235 240
 45 Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Val Leu Gln Ala
 245 250 255
 Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile Gly Trp Arg Lys Asp Ala Leu His Leu
 260 265 270
 50 Leu Val Phe Thr Thr Asp Asp Val Pro His Ile Ala Leu Asp Gly Lys
 275 280 285
 Leu Gly Gly Leu Val Gln Pro His Asp Gly Gln Cys His Leu Asn Glu
 290 295 300
 55 Ala Asn Glu Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Met Asp Tyr Pro Ser Leu Ala
 305 310 315 320

60

65

ES 2 346 041 T3

Cys Val Glu Cys Pro Leu Leu His Ser Gly Lys Pro Asp Asn Gln Thr
 645 650 655
 5 Cys His Ser Leu Cys Arg Asp Glu Val Ile Thr Trp Val Asp Thr Ile
 660 665 670
 Val Lys Asp Asp Gln Glu Ala Val Leu Cys Phe Tyr Lys Thr Ala Lys
 675 680 685
 10 Asp Cys Val Met Met Phe Thr Tyr Val Glu Leu Pro Ser Gly Lys Ser
 690 695 700
 Asn Leu Thr Val Leu Arg Glu Pro Glu Cys Gly Asn Thr Pro Asn Ala
 705 710 715 720
 15 Met Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Gly Ser Ile Leu Leu Val Gly Leu
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ala Ile Trp Lys Leu Leu Val Thr Ile His Asp Arg Arg
 740 745 750
 20 Glu Phe Ala Lys Phe Gln Ser Glu Arg Ser Arg Ala Arg Tyr Glu Met
 755 760 765
 25 Ala Ser Asn Pro Leu Tyr Arg Lys Pro Ile Ser Thr His Thr Val Asp
 770 775 780
 Phe Thr Phe Asn Lys Phe Asn Lys Ser Tyr Asn Gly Thr Val Asp
 785 790 795
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65