

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N° 3 219 726

Depositato il 17.03.16

a nome: Tillotts Pharma AG

di nazionalità: svizzera

a: Rheinfelden (Svizzera)

dal titolo: ANTICORPI ANTI-TNF' ALFA E FRAMMENTI
FUNZIONALI DI ESSI

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda molecole anticorpali e relativi frammenti funzionali, in grado di legarsi al fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), a processi per la loro produzione e a loro usi terapeutici.

CONTESTO

TNF α è una citochina proinfiammatoria omotrimerica che viene rilasciata e interagisce con le cellule del sistema immunitario. È stato anche mostrato che TNF α è sovraregolato in una serie di malattie umane, incluse malattie croniche come artrite reumatoide, morbo di Crohn, colite ulcerosa e sclerosi multipla.

Gli anticorpi verso TNF α sono stati proposti per la profilassi e il trattamento dello shock endotossico (Beutler et al., Science, 234, 470-474, 1985). Bodmer

et al., (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) e Wherery et al., (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) discutono il potenziale terapeutico degli anticorpi anti-TNF α nel trattamento dello shock settico. L'uso di anticorpi anti-TNF α nel trattamento dello shock settico viene anche discusso da Kirschenbaum et al., (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). L'artrite indotta dal collagene può essere trattata efficacemente usando un anticorpo monoclonale anti-TNF α (Williams et al. (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

L'uso di anticorpi anti-TNF α nel trattamento di artrite reumatoide e morbo di Crohn è discusso in Feldman et al. (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al. (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) e in Feldman et al. (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Gli anticorpi verso TNF α precedentemente usati in tali trattamenti sono generalmente anticorpi chimerici, come quelli descritti nel brevetto statunitense N. 5,919,452.

Anticorpi monoclonali contro TNF α sono stati descritti nella tecnica anteriore. Meager et al. (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) descrivono gli anticorpi monoclonali murini contro TNF α ricombinante. Fendly et

al. (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) descrivono l'uso di anticorpi monoclonali murini contro TNF α ricombinante nella definizione di epitopi neutralizzanti verso TNF α . Inoltre, nella Domanda di brevetto internazionale WO 92/11383, vengono descritti anticorpi ricombinanti, inclusi anticorpi innestati con CDR, specifici per TNF α . Rankin et al. (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) descrivono l'uso di tali anticorpi innestati con CDR nel trattamento dell'artrite reumatoide. Il brevetto statunitense N. 5,919,452 descrive anticorpi chimerici anti-TNF α e il loro uso nel trattamento di patologie associate alla presenza di TNF α . Ulteriori anticorpi anti-TNF α sono descritti in Stephens et al. (Immunology, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570, GB-A-2 297 145, US 8,673,310, US 2014/0193400, EP 2 390 267 B1, US 8,293,235, US 8,697,074, WO 2009/155723 A2 e WO 2006/131013 A2.

Le molecole anticorpali anti-TNF α ricombinanti della tecnica anteriore hanno generalmente un'affinità ridotta per TNF α rispetto agli anticorpi da cui derivano le regioni ipervariabili o CDR. Tutti gli inibitori di TNF α attualmente in commercio vengono somministrati per via endovenosa o sottocutanea a intervalli settimanali o più lunghi come iniezioni in bolo, con conseguenti concentrazioni iniziali elevate

che diminuiscono costantemente fino all'iniezione successiva.

I farmaci bioterapici anti-TNF α attualmente approvati includono (i) infliximab, un anticorpo monoclonale anti-IgG umana chimerico (Remicade®); (ii) etanercept, una proteina di fusione dimerica TNFR2, con una Fc di IgG1 (Enbrel®); (iii) adalimumab, un anticorpo monoclonale completamente umano (mAb) (Humira®) e (iv) certolizumab, un frammento Fab PEGilato (Cimzia®). Tuttavia, vari biosimilari sono in fase di sviluppo e un mimetico di infliximab noto come Remsima è già stato approvato in Europa.

Infliximab ha un'affinità relativamente bassa per TNF α ($K_D > 0,2$ nM; Weir et al., 2006, Therapy 3: 535) e una potenza di neutralizzazione limitata in un saggio L929. Inoltre, infliximab non mostra sostanzialmente alcuna reattività incrociata con TNF α di scimmie *Cynomolgus* o *Rhesus*. Per gli anticorpi anti-TNF α , tuttavia, la reattività incrociata con TNF α di scimmia è altamente desiderabile, poiché ciò consente test sugli animali con primati, riflettendo la situazione nell'uomo in molti aspetti.

Etanercept, sebbene sia una molecola bivalente, lega TNF α in un rapporto di un trimero per una molecola di etanercept, precludendo la formazione di

grandi complessi antigene-agenti bioterapeutici (Wallis, 2008, Lancet Infect Dis, 8: 601). Esso non inibisce la secrezione di citochine indotta da LPS nei monociti (Kirchner et al., 2004, Cytokine, 28: 67).

La potenza di adalimumab è simile a quella di infliximab. Un altro svantaggio di adalimumab è la sua scarsa stabilità, per esempio come determinato in un test di denaturazione termica. È stato determinato che la temperatura di fusione (T_m) di adalimumab in tale test è $67,5^\circ$ C. Tuttavia, minore è il valore T_m di un anticorpo, minore è la sua stabilità generale. Una T_m inferiore rende gli anticorpi meno adatti per l'uso farmaceutico, per esempio per la somministrazione orale.

La potenza di certolizumab è leggermente superiore a quella di infliximab, ma non è ancora soddisfacente. Certolizumab non inibisce la proliferazione delle cellule T in un MLR (Vos et al., 2011, Gastroenterology, 140: 221).

EP 2 623 515 A1 descrive anticorpi anti-TNF α e relativi frammenti leganti l'antigene (Fab), in cui la potenza dei frammenti Fab umanizzati risultanti è paragonabile a o soltanto leggermente migliore di quella di infliximab in un saggio di neutralizzazione L929 e la reattività incrociata degli anticorpi lega

debolmente TNF α di Rhesus.

WO 2012/007880 A2 descrive una molecola legante l'antigene a dominio singolo (SDAB, Single Domain Antigen Binding Molecule) modificata sotto forma di proteine di fusione comprendenti uno o più singoli domini leganti l'antigene che si legano a uno o più bersagli (per esempio TNF α , un linker e una o più molecole polimeriche).

WO 2015/144852 A1 indaga le proprietà di un scFv anti-TNF α denominato "scF v1". Questo scFv ha mostrato una capacità di neutralizzazione di TNF α in un saggio su cellule PK-15 che era paragonabile a quella di infliximab.

WO 2015/065987 A1 descrive anticorpi anti-TNF α , anticorpi anti-IL-6 e anticorpi bispecifici che si legano a entrambi gli antigeni. Determinati anticorpi anti-TNF α hanno mostrato una reattività incrociata con TNF α di Cynomolgus.

In "Infliximab (Remicade)", Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley-VCH, Weinheim, pagine 885-904, M. Wiekowski et al. vengono riassunte le caratteristiche di infliximab, noto anche come Remicade.

In "Adalimumab (Humira)", Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley-VCH, Weinheim, pagine 697-732, H.

Kupper et al. vengono riassunte le informazioni sull'anticorpo approvato adalimumab.

Melmed Gil Y. et al descrivono in "Certolizumab pegol", Nature Reviews. Drug Discovery, Nature Publishing Group, GB, vol. 7, no. 8, 2008, pagine 641-642, il frammento di anticorpo pegilato certolizumab pegol.

M. Sohini et al. riassumono in "Golimumab", MABS, Landes Bioscience, USA, vo. 1, n. 5, 2009, pagine 422-431, dati sull'anticorpo golimumab. Golimumab è un anticorpo ad alta affinità, caratterizzato da una K_D di circa 17 pM.

La pubblicazione scientifica "CDP571: anticorpo monoclonale anti-TNF, BAY 103356, BAY W 3356, Humicade2, Drugs in R & D, ADIS International, Auckland, NZ, vol. 4, no. 3, 2003, pagine 174-178 si riferisce all'anticorpo umanizzato "Humicade" (CDP 571; BAY 103356), un anticorpo monoclonale anti-TNF α ad alta affinità.

Vi è la necessità di molecole anticorpali migliorate per il trattamento di malattie infiammatorie croniche come i disturbi infiammatori intestinali. Le molecole anticorpali devono avere almeno (i) un'elevata affinità a TNF α umano (vale a dire un K_D < 125 pM), (ii) un'elevata potenza

nell'inibire l'apoptosi indotta da TNF α in cellule L929, (iii) un'elevata potenza nell'inibire la secrezione di citochine indotta da LPS, (iv) una sostanziale affinità a TNF α da *Cynomolgus* e *Rhesus* (per esempio un $K_D < 1$ nM), e (v) una temperatura di fusione elevata del dominio variabile come determinato in un esperimento di denaturazione termica (per esempio un $T_m > 70^\circ$ C).

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Gli inventori della presente domanda hanno riscontrato che determinati anticorpi anti-TNF α e relativi frammenti funzionali mostrano una combinazione di proprietà favorevoli, inclusa l'alta affinità a TNF α umano ($K_D < 125$ pM), una potenza per inibire l'apoptosi indotta da TNF α in cellule L929 maggiore di quella di infliximab, una potenza per inibire la secrezione di citochine indotta da LPS maggiore di quella di adalimumab e una sostanziale affinità ($K_D < 1$ nM) a TNF α da animali come la scimmia *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) e/o macachi *Rhesus* (*Macaca mulatta*). Inoltre, gli anticorpi e i relativi frammenti funzionali erano specifici per TNF α in quanto non si legavano in modo significativo a TNF β e mostravano una stabilità significativa, come determinato in un saggio di denaturazione termica del

dominio variabile.

L'invenzione fornisce molecole anticorpali e relativi frammenti funzionali.

La presente invenzione si riferisce pertanto all'oggetto definito nelle seguenti voci da (1) a (43):

(1) Un anticorpo o un relativo frammento funzionale in grado di legarsi al fattore di necrosi tumorale umano alfa ($TNF\alpha$), in cui detto anticorpo o relativo frammento funzionale comprende (i) un dominio V_L avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 14, e (ii) un dominio V_H avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO.13.

(2) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (1), in cui detto anticorpo o relativo frammento funzionale si lega specificamente a $TNF\alpha$ umano.

(3) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (1) o (2), in cui detto anticorpo o relativo frammento funzionale non si lega in modo significativo a $TNF\beta$.

(4) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui detto anticorpo o frammento funzionale

(i) si lega a $TNF\alpha$ umano con una costante di dissociazione (K_D) inferiore a 125 pM;

(ii) è cross-reattivo con $TNF\alpha$ di *Macaca mulatta*

e con TNF α di *Macaca fascicularis*;

(iii) ha una potenza maggiore rispetto a infliximab, come determinato da un saggio L929; e/o

(iv) è in grado di legarsi a TNF_{trimero} umano in una stechiometria (anticorpo: TNF_{trimero}) di almeno 2.

(5) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che si lega a TNF α umano con una K_D inferiore a 100 pM, preferibilmente inferiore a 50 pM.

(6) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che si lega a TNF α di *Macaca mulatta* con una K_D inferiore a 1 nM.

(7) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che si lega a TNF α di *Macaca fascicularis* con una K_D inferiore a 1 nM.

(8) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la potenza dell'anticorpo o del frammento funzionale per inibire l'apoptosi indotta da TNF α rispetto a quella di infliximab (potenza relativa), determinata in un saggio L929, è maggiore di 5, e in cui detta potenza relativa è il rapporto tra il valore di IC₅₀ in ng/ml di infliximab nel saggio L929 e il valore di IC₅₀ in ng/ml dell'anticorpo in formato scFv nel saggio L929.

(9) L'anticorpo o il frammento funzionale di una

qualsiasi delle voci precedenti, in cui la temperatura di fusione del dominio variabile dell'anticorpo in formato scFv, determinata mediante fluorimetria a scansione differenziale, è di almeno 65° C.

(10) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la temperatura di fusione del dominio variabile dell'anticorpo in formato scFv, determinata mediante fluorimetria a scansione differenziale, è di almeno 68° C.

(11) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la temperatura di fusione, determinata mediante fluorimetria a scansione differenziale, è di almeno 70° C.

(12) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la perdita di contenuto di monomero, dopo cinque cicli consecutivi di congelamento-scongelo, è inferiore allo 0,2%.

(13) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la perdita nel contenuto di monomero, dopo conservazione per quattro settimane a 4° C, è inferiore all'1%.

(14) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la potenza dell'anticorpo o del frammento funzionale per bloccare l'interazione tra TNF α umano e il recettore I di TNF

(TNFRI), rispetto a quella di infliximab (potenza relativa), come determinato in un ELISA di inibizione, è almeno 2, in cui detta potenza relativa è il rapporto tra il valore di IC₅₀ in ng/ml di infliximab e il valore di IC₅₀ in ng/ml dell'anticorpo in formato scFv.

(15) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, in cui la potenza dell'anticorpo o del frammento funzionale per bloccare l'interazione tra TNF α umano e il recettore II di TNF (TNFRII), rispetto a quella di infliximab (potenza relativa), come determinato in un ELISA di inibizione, è almeno 2, in cui detta potenza relativa è il rapporto tra il valore di IC₅₀ in ng/ml di infliximab e il valore di IC₅₀ in ng/ml dell'anticorpo in formato scFv.

(16) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che è in grado di inibire la proliferazione cellulare di cellule mononucleate di sangue periferico in una reazione linfocitaria mista.

(17) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che è in grado di inibire la secrezione di interleuchina-1 β indotta da LPS da monociti CD14⁺.

(18) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (17), in cui il valore di IC_{50} per inibire la secrezione di interleuchina- 1β indotta da LPS è inferiore a 1 nM.

(19) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (18), in cui detto valore di IC_{50} per inibire la secrezione di interleuchina- 1β indotta da LPS, su base molare, è inferiore a quello di adalimumab.

(20) L'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti, che è in grado di inibire la secrezione di $TNF\alpha$ indotta da LPS da monociti $CD14^+$.

(21) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (20), in cui il valore di IC_{50} per inibire la secrezione di $TNF\alpha$ indotta da LPS è inferiore a 1 nM.

(22) L'anticorpo o il frammento funzionale della voce (21), in cui detto valore di IC_{50} per inibire la secrezione di $TNF\alpha$ indotta da LPS, su base molare, è inferiore a quello di adalimumab.

(23) L'anticorpo di una qualsiasi delle voci precedenti, che è un'immunoglobulina G (IgG).

(24) Il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci da (1) a (22), che è un frammento variabile a catena singola (scFv).

(25) Il frammento funzionale della voce (24), in

cui detto scFv ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:15.

(26) Il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci da (1) a (22), che è un diabody.

(27) Il frammento funzionale della voce (26), in cui detto diabody comprende o è costituito dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:51.

(28) Un acido nucleico codificante l'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci precedenti.

(29) Un vettore o plasmide comprendente l'acido nucleico della voce (28).

(30) Una cellula comprendente l'acido nucleico della voce (28) o il vettore o il plasmide della voce (29).

(31) Un metodo per preparare l'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi delle voci da (1) a (27), comprendente la coltura della cellula della voce (30) in un terreno in condizioni che consentono l'espressione dell'acido nucleico codificante l'anticorpo o il frammento funzionale, e il recupero dell'anticorpo o del frammento funzionale dalle cellule o dal terreno.

(32) Una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo o il frammento funzionale di una qualsiasi

delle voci da (1) a (27) e facoltativamente un veicolante e/o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

(33) L'anticorpo o il frammento funzionale come definito in una qualsiasi delle voci da (1) a (27) per l'uso in un metodo di trattamento di un disturbo infiammatorio o di un disturbo correlato a TNF α .

(34) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (33), in cui detto disturbo infiammatorio è selezionato dall'elenco di malattie e disturbi elencati nella sezione "Disturbi da trattare" di seguito.

(35) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (33), in cui detto disturbo infiammatorio è un disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale.

(36) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (35), in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è una malattia infiammatoria intestinale.

(37) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (35) o (36), in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è morbo di Crohn.

(38) L'anticorpo o il frammento funzionale da

usare secondo la voce (37), in cui detto morbo di Crohn è selezionato dal gruppo costituito da morbo di Crohn superiore ileale, colonico, ileocolonico e/o isolato (gastrico, duodenale e/o digiunale) e include comportamenti di malattia non restrittivo/non penetrante, restrittivo, penetrante e perianale, consentendo qualsiasi combinazione di localizzazione e comportamento della malattia di uno qualsiasi dei suddetti.

(39) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (35) o (36), in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è la colite ulcerosa.

(40) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (39), in cui detta colite ulcerosa è selezionata dal gruppo costituito da proctite ulcerosa, proctosigmoidite, colite del lato sinistro, colite panulcerosa e pouchite.

(41) L'anticorpo o il frammento funzionale da usare secondo la voce (35) o (36), in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è colite microscopica.

(42) L'anticorpo o il frammento funzionale per l'uso secondo uno qualsiasi degli articoli da (33) a (41), in cui detto metodo comprende la

somministrazione orale dell'anticorpo o del frammento funzionale a un soggetto.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1: Rappresentazione schematica del processo di umanizzazione.

Figura 2: Cromatogrammi SE-HPLC di preparati scFv umanizzati purificati di uno scFv. Il monomero scFv eluisce a tempi di ritenzione compresi tra 8,5 e 9,5 minuti, mentre i componenti tampone eluiscono a > 10 minuti. Tutti i picchi dal volume morto della colonna fino al rispettivo monomero scFv sono stati integrati come aggregati/oligomeri e usati per il calcolo dell'area di picco relativa.

Figura 3: Curve di denaturazione termica dalle misurazioni DSF di due costrutti scFv. Per ogni costrutto vengono mostrate le misurazioni in duplicato. I valori T_m risultanti sono stati determinati adattando i dati a un'equazione di Boltzmann per ottenere il punto medio della transizione.

Figura 4: Andamento temporale del contenuto di monomero dei due costrutti scFv durante la conservazione. Il contenuto di monomero come determinato mediante SE-HPLC è stato tracciato per le temperature di conservazione 4, -20 e < -65° C per la durata di 4 settimane.

Figura 5: Sovrapposizione di cromatogrammi SE-HPLC per due molecole scFv. Per ogni scFv viene mostrato il campione (10 mg/ml) a d0 e dopo la conservazione per 4 settimane a 4° C. Inoltre, viene mostrato il cromatogramma del campione dopo 5 cicli di congelamento e scongelamento. Il pannello inserito mostra un ingrandimento di circa 15 volte dell'asse y per ciascuna molecola, per visualizzare anche minuscole variazioni del contenuto di oligomeri.

Figura 6: Andamento temporale del contenuto di monomero degli scFv umanizzati durante la conservazione. Il contenuto di monomero come determinato mediante SE-HPLC è stato tracciato per i campioni da 10 mg/ml a una temperatura di conservazione di 37° C per la durata di 4 settimane.

Figura 7: Capacità di neutralizzare TNF α umano nel saggio L929 di due scFv. Per ogni esperimento vengono mostrate le curve dose-risposta per scFv e anticorpo di riferimento infliximab. Le concentrazioni più elevate di scFv e infliximab, nonché i controlli negativi, sono stati impostati al 100% e allo 0% di crescita.

Figura 8: Potenza di due scFv per neutralizzare TNF α di primate non umano e umano nel saggio L929. Sono mostrate le curve dose-risposta per la

neutralizzazione di TNF α umano, di scimmia Cynomolgus e di scimmia Rhesus. La concentrazione di scFv più alta e i controlli negativi sono stati impostati al 100% e allo 0% di crescita.

Figura 9: Potenza di due scFv per bloccare l'interazione TNF α -TNFRI. Vengono mostrate le curve dose-risposta. La concentrazione di scFv più alta e i controlli negativi sono stati impostati allo 0% e al 100% del legame di TNF α a TNFRI.

Figura 10: Potenza di due scFv per bloccare l'interazione TNF α -TNFRII. Vengono mostrate le curve dose-risposta. La concentrazione di scFv più alta e i controlli negativi sono stati impostati allo 0% e al 100% del legame di TNF α a TNFRII.

Figura 11: Specificità di bersaglio di uno scFv. Il potenziale di inibire l'interazione di TNF α biotinilato con scFv da parte di TNF α e TNF β è stato analizzato mediante ELISA competitivo. Sono mostrati gli effetti dipendenti dalla dose di TNF α e TNF β .

La Figura 12 raffigura la formazione di complessi 16-22-H5-scFv:TNF α determinati mediante SE-HPLC (Esempio 4).

La Figura 13 raffigura il legame simultaneo di due molecole di TNF α a 16-22-H5-scDb determinato mediante SPR (Esempio 5).

La Figura 14A raffigura la formazione di complessi 16-22-H5-IgG:TNF α (Esempio 5).

La Figura 14B raffigura la formazione di complessi 16-22-H5-scDb:TNF α (Esempio 5).

La Figura 15 raffigura l'inibizione della proliferazione cellulare in una MLR dopo il trattamento con anti-TNF α . *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ rispetto al controllo IgG (Esempio 6).

La Figura 16 mostra la capacità dei differenti formati di anticorpi di 16-22-H5 e adalimumab di inibire la secrezione indotta da LPS di IL-1 β (Figura 16A) e TNF α (Figura 16B) nei monociti in modo dipendente dalla dose (Esempio 7).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

La presente invenzione riguarda un anticorpo o un relativo frammento funzionale in grado di legarsi a TNF α umano.

Nel contesto della presente domanda, il termine "anticorpo" è usato come sinonimo di "immunoglobulina" (Ig), che è definita come una proteina appartenente alla classe IgG, IgM, IgE, IgA o IgD (o qualsiasi sottoclasse di essi) e include tutti gli anticorpi convenzionalmente noti e i relativi frammenti funzionali. Nel contesto della presente invenzione, un "frammento funzionale" di un anticorpo/immunoglobulina

è definito come frammento legante l'antigene o altro derivato di un anticorpo parentale che essenzialmente mantiene una o più delle proprietà di tale anticorpo parentale a cui si fa riferimento nelle voci da (1) a (27) sopra nella presente. Un "frammento legante l'antigene" di un anticorpo/immunoglobulina è definito come un frammento (per esempio, una regione variabile di una IgG) che trattiene la regione legante l'antigene. Una "regione legante l'antigene" di un anticorpo si trova tipicamente in una o più regioni ipervariabili di un anticorpo, vale a dire le regioni CDR-1, -2 e/o-3. "Frammenti leganti l'antigene" dell'invenzione includono il dominio di un frammento $F(ab')_2$ e un frammento Fab. I "frammenti funzionali" dell'invenzione includono, scFv, dsFv, diabody, triabody, tetrabody e proteine di fusione Fc. $F(ab')_2$ o Fab possono essere progettati per ridurre al minimo o rimuovere completamente le interazioni disolfuro intermolecolari che si verificano tra i domini CH1 e CL. Gli anticorpi o frammenti funzionali della presente invenzione possono essere parte di costrutti bi o multifunzionali.

I frammenti funzionali preferiti nella presente invenzione sono scFv e diabody.

Un scFv è un frammento Fv a catena singola in cui

i domini variabile leggero ("V_L") e variabile pesante ("V_H") sono collegati da un ponte peptidico.

Un diabody è un dimero costituito da due frammenti, ciascuno avente regioni variabili unite insieme tramite un linker o simili (di seguito indicati come frammenti che formano diabody), e tipicamente contengono due V_L e due V_H. I frammenti che formano il diabody includono quelli costituiti da V_L e V_H, V_L e V_L, V_H e V_H, ecc., preferibilmente V_H e V_L. Nei frammenti che formano diabody, il linker che unisce regioni variabili non è specificamente limitato, ma preferibilmente abbastanza corto da evitare legami non covalenti tra regioni variabili nello stesso frammento. La lunghezza di un tale linker può essere determinata come appropriato dagli esperti del ramo, ma tipicamente 2-14 amminoacidi, preferibilmente 3-9 amminoacidi, specialmente 4-6 amminoacidi. In questo caso, V_L e V_H codificati sullo stesso frammento sono uniti tramite un linker abbastanza corto per evitare legami non covalenti tra V_L e V_H sulla stessa catena e per evitare la formazione di frammenti di regione variabile di catena singola così che è possibile formare dimeri con un altro frammento. I dimeri possono essere formati tramite legami covalenti o non covalenti o entrambi tra i frammenti che formano il

diabody.

Inoltre, i frammenti che formano diabody possono essere uniti tramite un linker o simili per formare diabody a catena singola ($sc(Fv)_2$). Unendo frammenti che formano diabody usando un linker lungo di circa 15-20 amminoacidi, è possibile formare legami non covalenti tra i frammenti che formano il diabody esistenti sulla stessa catena per formare dimeri. Basandosi sullo stesso principio della preparazione dei diabody, gli anticorpi polimerizzati come trimeri o tetrameri possono anche essere preparati unendo tre o più frammenti che formano il diabody.

Preferibilmente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione si lega specificamente a $TNF\alpha$. Come usato nella presente, un anticorpo o un relativo frammento funzionale "riconosce specificamente", o "si lega specificamente a" $TNF\alpha$ umano, quando l'anticorpo o il frammento funzionale è in grado di discriminare tra $TNF\alpha$ umano e una o più molecole di riferimento. Preferibilmente, il valore di IC_{50} per il legame a ciascuna delle molecole di riferimento è almeno 1.000 volte maggiore del valore di IC_{50} per il legame a $TNF\alpha$, in particolare come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.4. Nella sua forma più generale (e quando non viene menzionato

alcun riferimento definito), "legame specifico" si riferisce alla capacità dell'anticorpo o del frammento funzionale di discriminare tra TNF α umano e una biomolecola non correlata, come determinato, per esempio, in conformità con un metodo di saggio di specificità noti nel ramo. Tali metodi comprendono, in via non limitativa, Western blot e test ELISA. Per esempio, è possibile eseguire un saggio ELISA standard. Tipicamente, la determinazione della specificità di legame viene effettuata usando non una singola biomolecola di riferimento, ma un insieme di circa tre-cinque biomolecole non correlate, come latte in polvere, BSA, transferrina o simili. In una forma di realizzazione, il legame specifico si riferisce alla capacità dell'anticorpo o del frammento di discriminare tra TNF α umano e TNF β umano.

L'anticorpo dell'invenzione o frammento funzionale dell'invenzione comprende un dominio V_L e un dominio V_H. Il dominio V_L comprende una regione CDR1 (CDRL1), una regione CDR2 (CDRL2), una regione CDR3 (CDRL3) e regioni cornice. Il dominio V_H comprende una regione CDR1 (CDRH1), una regione CDR2 (CDRH2), una regione CDR3 (CDRH3) e regioni cornice.

Il termine "CDR" si riferisce a una delle sei regioni ipervariabili all'interno dei domini variabili

di un anticorpo che contribuiscono principalmente al legame dell'antigene. Una delle definizioni più comunemente usate per i sei CDR è stata fornita da Kabat E. A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. Pubblicazione NIH 91-3242). Come usato nella presente, la definizione di Kabat di CDR si applica soltanto a CDR1, CDR2 e CDR3 del dominio variabile di catena leggera (L1 CDR, L2 CDR, L3 CDR o L1, L2, L3), nonché a CDR2 e CDR3 del dominio variabile di catena pesante (H2 CDR, H3 CDR o H2, H3). CDR1 del dominio variabile di catena pesante (H1 CDR o H1), tuttavia, come usato nella presente è definito dai seguenti residui (numerazione Kabat): Inizia con la posizione 26 e termina prima della posizione 36.

La regione CDR1 del dominio V_L è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:7. La regione CDR2 del dominio V_L è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:8. La regione CDR3 del dominio V_L è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:9.

La regione CDR1 del dominio V_H è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 10. La regione CDR2 del dominio V_H è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:11. La regione CDR3 del dominio V_H è costituita dalla

sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:12.

L'anticorpo dell'invenzione o il frammento funzionale dell'invenzione comprende un dominio V_H avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 13. Inoltre, l'anticorpo o il frammento funzionale comprende un dominio V_L avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:14.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, il frammento funzionale è un anticorpo a catena singola (scFv) comprendente un dominio V_H avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:13 e un dominio V_L avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 14. Il dominio V_H e il dominio V_L sono preferibilmente collegati da un linker peptidico. Il linker peptidico (di seguito denominato "linker A") ha tipicamente una lunghezza da circa 10 a circa 30 amminoacidi, più preferibilmente da circa 15 a circa 25 amminoacidi. Il linker A comprende tipicamente residui di Gly e Ser, ma sono possibili anche altri amminoacidi. In forme di realizzazione preferite, il linker comprende ripetizioni multiple della sequenza GGGGS (SEQ ID NO:50), per esempio da 2 a 6, o da 3 a 5, o 4 ripetizioni consecutive della sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 50. Più preferibilmente,

il linker A è costituito dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NQ:49. L'scFv può avere la seguente struttura (con il terminale N a sinistra e il terminale C a destra):

V_L -LinkerA- V_H ; o

V_H -LinkerA- V_L .

Più preferibilmente, il frammento funzionale è un anticorpo a catena singola (scFv) costituito dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 15.

In un'altra forma di realizzazione particolarmente preferita, il frammento funzionale è un diabody comprendente un dominio V_H avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:13 e un dominio V_L avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 14. Il dominio V_H e il dominio V_L sono collegati da un linker peptidico. Il linker peptidico (di seguito indicato come "linkerB") ha preferibilmente una lunghezza da circa 2 a circa 10 amminoacidi, più preferibilmente di circa 5 amminoacidi. Il linkerB comprende tipicamente residui di Gly e Ser, ma sono possibili anche altri amminoacidi. Più preferibilmente, il linkerB è costituito dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NQ:50.

Il diabody preferibilmente è un diabody

monospecifico, vale a dire è diretto a un solo epitopo. Il diabody è preferibilmente un omodimero. Il diabody può essere un dimero di due catene polipeptidiche che sono legate in modo non covalente l'una all'altra. Ciascun monomero può essere una catena polipeptidica avente la struttura:

V_L -LinkerB- V_H ; o

V_H -LinkerB- V_L .

Inoltre, i frammenti che formano il diabody possono essere uniti tramite un linkerA o simili per formare diabody a catena singola ($sc(Fv)_2$). Unendo frammenti che formano diabody usando un linker lungo di circa 15-20 amminoacidi, è possibile formare legami non covalenti tra i frammenti che formano il diabody esistenti sulla stessa catena per formare dimeri. Esempi delle disposizioni dei diabody a catena singola includono quanto segue.

V_H - linkerB - V_L - linkerA - V_H linkerB - V_L

V_L - linkerB - V_H - linkerA - V_L - linkerB - V_H

Preferibilmente il diabody dell'invenzione ha la seguente struttura:

V_L - linkerB - V_H - linkerA - V_L - linkerB - V_H

Più preferibilmente il diabody è costituito dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:51.

Basandosi sullo stesso principio della

preparazione dei diabody, gli anticorpi polimerizzati come trimeri o tetrameri possono anche essere preparati unendo tre o più frammenti che formano il diabody.

In un'altra forma di realizzazione particolare, l'anticorpo dell'invenzione è un'immunoglobulina, preferibilmente un'immunoglobulina G (IgG). La sottoclasse di IgG dell'invenzione non è limitata e include IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Preferibilmente, l'IgG dell'invenzione è di sottoclasse 1, vale a dire è una molecola di IgG₁. In una forma di realizzazione, ciascuna catena leggera della molecola IgG dell'invenzione ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:52, e/o ciascuna catena pesante della molecola IgG dell'invenzione ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:53. Una IgG specifica dell'invenzione consiste di due catene leggere e due catene pesanti, in cui ciascuna delle due catene leggere ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:52, e ciascuna delle due catene pesanti ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:53.

Affinità

L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha un'elevata affinità a TNF α umano.

Il termine "K_D" si riferisce alla costante di equilibrio di dissociazione di una particolare interazione anticorpo-antigene. Tipicamente, l'anticorpo o frammento funzionale dell'invenzione si lega a TNF α umano con una costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) inferiore a circa 2x10⁻¹⁰ M, preferibilmente inferiore a 1,5x10⁻¹⁰ M, preferibilmente inferiore a 1,25x10⁻¹⁰, più preferibilmente inferiore a 1x10⁻¹⁰ M, in modo massimamente preferibile inferiore a 7,5x10⁻¹¹ M o addirittura inferiore a 5x10⁻¹¹ M, come determinato usando la tecnologia di risonanza plasmonica superficiale (SPR) in uno strumento BIACORE. In particolare, la determinazione del K_D viene eseguita come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.1.

Reattività incrociata a TNF α di scimmie Cynomolgus o macachi Rhesus

In forme di realizzazione particolari, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha una sostanziale affinità con TNF α di animali come scimmie Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e/o macachi Rhesus (*Macaca mulatta*). Ciò è vantaggioso, poiché i test preclinici di anticorpi anti-TNF α umani come gli studi di tossicità sono preferibilmente effettuati con tali animali. Di conseguenza, l'anticorpo o il

frammento funzionale dell'invenzione è preferibilmente cross-reattivo con TNF α da animali come scimmie *Cynomolgus* e/o macachi Rhesus. Le misurazioni di affinità vengono eseguite come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.1.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è cross-reattivo con TNF α da *Macaca fascicularis*. L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha preferibilmente un'affinità a TNF α di *Macaca fascicularis* che è inferiore a 20 volte, in particolare inferiore a 10 volte, ancor più in particolare inferiore a 5 volte rispetto a quella di TNF α umano. Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione si lega a TNF α da *Macaca fascicularis* con una costante di equilibrio di dissociazione (K_D), in cui il rapporto $R_{M.fascicularis}$ tra

- (i) K_D per il legame a TNF α da *Macaca fascicularis* e
- (ii) K_D per il legame a TNF α umano è inferiore a 20.

$$R_{M.fascicularis} = \frac{K_D(M.fascicularis)}{K_D(uomo)}$$

$R_{M.fascicularis}$ è preferibilmente inferiore a 20, in particolare inferiore a 10, ancor più in particolare inferiore a 5.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo o

il frammento funzionale dell'invenzione è cross-reattivo con TNF α da *Macaca mulatta*. L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha preferibilmente un'affinità a TNF α di *Macaca mulatta* che è inferiore a 20 volte, più in particolare inferiore a 10 volte differente da quella di TNF α umano. Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione si lega a TNF α da *Macaca mulatta* con una costante di dissociazione all'equilibrio (K_D), in cui il rapporto $R_{M.mulatta}$ tra (i) K_D per il legame a TNF α da *Macaca mulatta* e (ii) K_D per il legame a TNF α umano è inferiore a 20.

$$R_{M.mulatta} = \frac{K_D(M.mulatta)}{K_D(uomo)}$$

$R_{M.mulatta}$ è preferibilmente inferiore a 20, in particolare inferiore a 10.

In ancora un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è cross-reattivo con TNF α da *Macaca fascicularis* e con TNF α da *Macaca mulatta*. L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha preferibilmente un'affinità a TNF α di *Macaca fascicularis* che è inferiore a 20 volte, in particolare inferiore a 10 volte, ancor più in particolare inferiore a 5 volte rispetto a quella di TNF α umano, e preferibilmente

un'affinità a TNF α di *Macaca mulatta* che è inferiore a 20 volte, più in particolare inferiore a 10 volte rispetto a quella di TNF α umano. Il rapporto $R_{M.fascicularis}$ dell'anticorpo o frammento funzionale è preferibilmente inferiore a 20, più in particolare inferiore a 10, ancor più in particolare inferiore a 5, e il rapporto $R_{M.mulatta}$ dell'anticorpo o frammento funzionale è preferibilmente inferiore a 20, in particolare inferiore a 10.

Capacità di inibire l'apoptosi di cellule L929 indotta da TNF α

L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha un'elevata potenza per inibire l'apoptosi indotta da TNF α di cellule L929. In una particolare forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha una potenza di inibire l'apoptosi indotta da TNF α di cellule L929 maggiore di quella dell'anticorpo noto infliximab.

La potenza relativa a infliximab può essere determinata in un saggio L929 come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.2 di questa domanda. La potenza relativa dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione è maggiore di 1,5, preferibilmente maggiore di 2, più preferibilmente maggiore di 3, più preferibilmente maggiore di 5, più

preferibilmente maggiore di 7,5, o persino maggiore di 10, in cui la potenza relativa è il rapporto tra (i) il valore di IC_{50} di infliximab in un saggio L929 rispetto (ii) al valore di IC_{50} dell'anticorpo o frammento funzionale dell'invenzione nel saggio L929, e in cui l' IC_{50} indica la concentrazione in ng/ml della rispettiva molecola necessaria per ottenere il 50% dell'inibizione massima dell'apoptosi indotta da $TNF\alpha$ di cellule L929.

In un'altra forma di realizzazione, la potenza relativa dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione è maggiore di 1,5, preferibilmente maggiore di 2, più preferibilmente maggiore di 3, più preferibilmente maggiore di 5, più preferibilmente maggiore di 7,5, o persino maggiore di 10, in cui la potenza relativa è il rapporto tra (i) il valore di IC_{90} di infliximab in un saggio L929 rispetto (ii) al valore di IC_{90} dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione nel saggio L929, e in cui il valore di IC_{90} indica la concentrazione in ng/ml della rispettiva molecola necessaria per ottenere il 90% dell'inibizione massima dell'apoptosi indotta da $TNF\alpha$ di cellule L929.

Inibizione della secrezione di citochine indotta da LPS

Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di inibire la secrezione di citochine indotta da LPS dai monociti. La secrezione di citochine indotta da LPS dai monociti può essere determinata come descritto nell'Esempio 7.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di inibire la secrezione di interleuchina-1 β da monociti CD14⁺ indotta da LPS. Il valore di IC₅₀ per inibire la secrezione di interleuchina-1 β indotta da LPS è preferibilmente inferiore a 1 nM e/o inferiore a 100 pg/ml. Il valore di IC₅₀ per inibire la secrezione di interleuchina-1 β indotta da LPS, su base molare e/o peso per volume, è preferibilmente inferiore a quello di adalimumab.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di inibire la secrezione di TNF α indotta da LPS dai monociti CD14⁺. Il valore di IC₅₀ per inibire la secrezione di TNF α indotta da LPS è preferibilmente inferiore a 1 nM e/o inferiore a 150 pg/ml. Il valore di IC₅₀ per inibire la secrezione di TNF α indotta da LPS, su base molare e/o peso per volume, è preferibilmente inferiore a quello di adalimumab.

Inibizione della proliferazione cellulare

L'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è tipicamente in grado di inibire la proliferazione cellulare di cellule mononucleate di sangue periferico in una reazione linfocitaria mista. L'inibizione della proliferazione cellulare può essere determinata come descritto nell'Esempio 6. L'indice di stimolazione dell'anticorpo o del frammento funzionale, per esempio scFv o diabody dell'invenzione, determinato secondo l'Esempio 6, è preferibilmente inferiore a 5, più preferibilmente inferiore a 4,5. In forme di realizzazione particolari, l'indice di stimolazione dell'anticorpo, per esempio dell'IgG dell'invenzione, è inferiore a 4 o persino inferiore a 3.

Inibizione dell'interazione tra TNF α e recettore di TNF

Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di inibire l'interazione tra TNF α umano e recettore I di TNF (TNFRI). L'inibizione dell'interazione tra TNF α umano e TNFRI può essere determinata in un ELISA di inibizione come descritto di seguito nell'Esempio 2, sezione 2.1.3.

La potenza dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione di inibire l'interazione

tra TNF α umano e TNFRI, rispetto a quella di infliximab (potenza relativa), come determinato in un ELISA di inibizione, è preferibilmente almeno 2, in cui detta potenza relativa è il rapporto tra il valore di IC₅₀ in ng/ml di infliximab e il valore di IC₅₀ in ng/ml dell'anticorpo o del relativo frammento funzionale.

Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di inibire l'interazione tra TNF α umano e recettore II di TNF (TNFR_{II}). L'inibizione dell'interazione tra TNF α umano e TNFR_{II} può essere determinata in un ELISA di inibizione come descritto di seguito nell'Esempio 2, sezione 2.1.3.

La potenza dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione per inibire l'interazione tra TNF α umano e TNFR_{II}, rispetto a quella di infliximab (potenza relativa), come determinato in un ELISA di inibizione, è preferibilmente almeno 2, più preferibilmente almeno 3, in cui detta potenza relativa è il rapporto tra il valore di IC₅₀ in ng/ml di infliximab e il valore di IC₅₀ in ng/ml dell'anticorpo o del relativo frammento funzionale.

Stechiometria e reticolazione

L'anticorpo o il frammento funzionale

dell'invenzione è tipicamente in grado di legarsi a $\text{TNF}\alpha_{\text{Trimerico}}$ umano in una stechiometria (anticorpo: $\text{TNF}\alpha_{\text{Trimerico}}$) di almeno 2. La stechiometria (anticorpo: $\text{TNF}\alpha_{\text{Trimerico}}$) è preferibilmente maggiore di 2, o almeno 2,5, o almeno 3. In una forma di realizzazione, la stechiometria (anticorpo: $\text{TNF}\alpha_{\text{Trimerico}}$) è di circa 3. La stechiometria (anticorpo: $\text{TNF}\alpha_{\text{Trimerico}}$) può essere determinata come descritto nell'esempio 4 di seguito.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione è in grado di formare un complesso con $\text{TNF}\alpha$ umano, in cui detto complesso comprende almeno due molecole di $\text{TNF}\alpha$ e almeno tre molecole di anticorpo o frammento funzionale. Il frammento funzionale secondo questa forma di realizzazione comprende almeno due siti di legame separati per $\text{TNF}\alpha$ come, per esempio, i diabody. La formazione di complesso può essere determinata come descritto nell'esempio 5 di seguito.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo è una IgG ed è in grado di formare un complesso di almeno 600 kDa con $\text{TNF}\alpha$. In un'altra forma di realizzazione, il frammento funzionale è un diabody ed è in grado di formare un complesso di almeno 300 kDa con $\text{TNF}\alpha$.

Selettività di bersaglio

In determinate forme di realizzazione,

l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione ha un'elevata selettività di bersaglio, vale a dire può discriminare tra TNF α e TNF β . Preferibilmente, il valore di IC₅₀ di TNF β è almeno 1.000 volte maggiore del valore di IC₅₀ di TNF α , come determinato in un ELISA competitivo come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.4. Più preferibilmente, il valore di IC₅₀ di TNF β è almeno 5.000 volte, più preferibilmente almeno 10.000 maggiore del valore di IC₅₀ di TNF α , come determinato in un ELISA competitivo come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.1.4.

Resa di espressione e resa di rinaturazione

In altre forme di realizzazione, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione, preferibilmente scFv o diabody, può essere espresso in modo ricombinante con resa elevata in microrganismi come batteri o in altre cellule. Preferibilmente, la resa di espressione in E. coli, determinata come descritto nell'Esempio 2, è di almeno 0,25 g/l. Ciò si applica in particolare ai frammenti funzionali come scFv.

La resa di rinaturazione, determinata come descritto nell'Esempio 2, è almeno 5 mg/l, più preferibilmente almeno 10 mg/l, più preferibilmente almeno 15 mg/l e più preferibilmente almeno 20 mg/l. Ciò si applica in particolare ai frammenti funzionali

come scFv.

Stabilità

Tipicamente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione, preferibilmente scFv o diabody, ha un'elevata stabilità. La stabilità può essere valutata con differenti metodologie. La "temperatura di fusione" T_m del dominio variabile dell'anticorpo o del frammento funzionale dell'invenzione, determinata mediante fluorimetria a scansione differenziale (DSF) come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.2.4, è preferibilmente di almeno 65° C, più preferibilmente almeno 68° C, più preferibilmente almeno 70° C. La "temperatura di fusione del dominio variabile", come usato nella presente, si riferisce alla temperatura di fusione di un scFv costituito dalla sequenza V_L - LinkerA - V_H , in cui la sequenza amminoacidica di LinkerA è costituita dalla sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:49. Per esempio, la temperatura di fusione del dominio variabile di un IgG è definita come la temperatura di fusione del suo scFv corrispondente come definito sopra.

La perdita di contenuto di monomero (a una concentrazione di 10 g/l; contenuto di monomero iniziale > 95%) dopo la conservazione per quattro

settimane a 4° C, determinato mediante cromatografia analitica ad esclusione dimensionale come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.2.5, è preferibilmente inferiore al 5%, più preferibilmente inferiore al 3%, più preferibilmente inferiore all'1 %, in modo massimamente preferibile inferiore allo 0,5%. La perdita di contenuto di monomero (a una concentrazione di 10 g/l; contenuto di monomero iniziale > 95%) dopo la conservazione per quattro settimane a -20° C, determinato mediante cromatografia analitica ad esclusione dimensionale come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.2.5, è preferibilmente inferiore al 5%, più preferibilmente inferiore al 3%, più preferibilmente inferiore all'1 %, in modo massimamente preferibile inferiore allo 0,5%. La perdita di contenuto di monomero (a una concentrazione di 10 g/l; contenuto di monomero iniziale > 95%) dopo la conservazione per quattro settimane a -65° C, determinato mediante cromatografia analitica ad esclusione dimensionale come descritto nell'Esempio 2, sezione 2.2.5, è preferibilmente inferiore al 5%, più preferibilmente inferiore al 3%, più preferibilmente inferiore all'1 %, in modo massimamente preferibile inferiore allo 0,5%.

La perdita di monomero dopo cinque cicli consecutivi di congelamento-scongelo, determinata

come descritto nell'Esempio 2, è inferiore al 5%, più preferibilmente inferiore all'1%, più preferibilmente inferiore allo 0,5%, in modo massimamente preferibile inferiore allo 0,2%, per esempio lo 0,1% o lo 0,0%.

Anticorpi e frammenti funzionali

Particolari forme di realizzazione dell'invenzione si riferiscono a frammenti funzionali degli anticorpi descritti nella presente. I frammenti funzionali includono un frammento $F(ab')_2$, un frammento Fab, scFv, diabody, triabody e tetrabody. Preferibilmente, il frammento funzionale è un anticorpo a catena singola (scFv) o un diabody. Più preferibilmente, le sequenze non CDR dello scFv o del diabody sono sequenze umane.

Preferibilmente, al fine di minimizzare il potenziale di immunogenicità negli esseri umani, lo scaffold accettore selezionato è composto da regioni cornice derivate da sequenze di consenso umano o sequenze germinali umane. In particolare, le regioni cornice da I a III del dominio variabile leggero sono costituite da sequenze di consenso VK1 umane secondo SEQ ID NO: da 56 a 58 e una regione cornice IV di una sequenza basata su linea germinale λ selezionata da SEQ ID NO: da 59 a 62. Poiché i residui che non sono consenso umano o residui della linea germinale umana

possono causare reazioni immunitarie, il numero di tali residui in ciascun dominio variabile (V_H o V_L) deve essere il più basso possibile, preferibilmente inferiore a 7, più preferibilmente inferiore a 4, più preferibilmente 0.

Preferibilmente l'anticorpo è un anticorpo monoclonale. Il termine "anticorpo monoclonale" come usato nella presente non è limitato agli anticorpi prodotti attraverso la tecnologia degli ibridomi. Il termine "anticorpo monoclonale" si riferisce a un anticorpo che è derivato da un singolo clone, incluso un qualsiasi clone eucariotico, procariotico, o fagico, e non al metodo mediante il quale esso viene prodotto. Gli anticorpi monoclonali possono essere preparati usando una tecnica da un'ampia gamma di tecniche note nel ramo, incluso l'uso di tecnologie dell'ibridoma, ricombinanti, e disposizione su fago, o una relativa combinazione. (Harlow e Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

In altre forme di realizzazione, incluse le forme di realizzazione relative all'uso *in vivo* degli anticorpi anti-TNF α negli esseri umani, possono essere usati anticorpi chimerici, primatizzati, umanizzati o umani. In una forma di realizzazione preferita,

l'anticorpo è un anticorpo umano o un anticorpo umanizzato, più preferibilmente un anticorpo umano monoclonale o un anticorpo monoclonale umanizzato.

Il termine anticorpo "chimerico" come usato nella presente si riferisce a un anticorpo avente sequenze variabili derivate da un'immunoglobulina non umana, come un anticorpo di ratto o topo, e regioni costanti di immunoglobuline umane, tipicamente selezionate da un modello di immunoglobulina umana. I metodi per produrre anticorpi chimerici sono noti nel ramo. Vedere, per esempio, Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi et al, 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; U.S. Pat. Nn. 5,807,715; 4,816,567; e 4,816397.

Differenti metodologie ricombinanti sono disponibili a un esperto del ramo per rendere un anticorpo non umano (per esempio murino) più simil umano generando immunoglobuline, catene immunoglobuliniche o relativi frammenti (come Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ o altre sottosequenze di anticorpi leganti bersagli), che contengono sequenze minime derivate da tale immunoglobulina non umana. In generale, l'anticorpo ricombinante risultante comprenderà sostanzialmente tutti di almeno uno, e

tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le regioni CDR corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni FR sono quelle di una sequenza di un'immunoglobulina umana, in particolare una sequenza di consenso di un'immunoglobulina umana. Gli anticorpi innestati con CDR sono molecole anticorpali aventi una o più regioni determinanti la complementarità (CDR) da un anticorpo originariamente generato in una specie non umana che si lega all'antigene desiderato e regioni cornice (FR) da una molecola immunoglobulinica umana (EP239400; Pubblicazione PCT WO 91/09967; Brevetto statunitense nn. 5,225,539; 5,530,101 e 5,585,089). Spesso, in un processo di "umanizzazione", i residui di cornice nelle regioni cornice umane verranno inoltre sostituiti con il corrispondente residuo derivato dall'anticorpo donatore di CDR per alterare, preferibilmente migliorare, il legame all'antigene. Queste sostituzioni di cornice vengono identificate mediante metodi noti nel ramo, per esempio, modellando le interazioni della CDR e dei residui di cornice per identificare residui di cornice importanti per il legame all'antigene e mediante comparazione di sequenza per identificare residui di cornice insoliti

in corrispondenza di specifiche posizioni. Vedere, per esempio, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7 e Queen et al, Brevetto statunitense nn.: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; e 6,180,370. Gli anticorpi possono essere resi più umani usando una varietà di tecniche aggiuntive note nel ramo tra cui, per esempio, veneering o resurfacing (EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol, 28:489-498; Studnicka et al, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973 e shuffling di catena (Brevetto statunitense n. 5,565,332). Un anticorpo umanizzato o innestato con CDR può anche comprendere almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina stampo umana scelta.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi umanizzati vengono preparati come descritto in Queen et al, Brevetto statunitense nn.: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; e 6,180,370.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-TNF α sono anticorpi umani. Anticorpi anti-TNF α completamente "umani" possono essere desiderabili per il trattamento terapeutico di pazienti umani. Come usato nella presente, "anticorpi umani" includono anticorpi aventi la sequenza amminoacidica di una

immunoglobulina umana e includono anticorpi isolati da librerie immunoglobuliniche umane o da animali transgenici per una o più immunoglobuline umane e che non esprimono immunoglobuline endogene. Gli anticorpi umani possono essere prodotti mediante una varietà di metodi noti nel ramo, inclusi i metodi di esposizione su fago descritti sopra usando librerie di anticorpi derivate da sequenze di immunoglobuline umane. Vedere, Brevetto statunitense nn. 4,444,887 e 4,716,111. e Pubblicazioni PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; e WO 91/10741. Gli anticorpi umani possono anche essere prodotti usando topi transgenici che sono incapaci di esprimere immunoglobuline endogene funzionali, tuttavia che possono esprimere geni di immunoglobuline umane. Vedere, per esempio, Pubblicazioni PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Brevetto statunitense nn. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; e 5,939,598. Anticorpi completamente umani che riconoscono un epitopo selezionato possono essere generati usando una tecnica chiamata "selezione guidata". In questo approccio un anticorpo monoclonale non umano selezionato, per esempio un anticorpo murino, viene usato per guidare

la selezione di un anticorpo completamente umano che riconosce lo stesso epitopo (Jespers et al, 1988, Biotechnology 12:899-903).

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-TNF α sono anticorpi primatizzati. Il termine "anticorpo primatizzato" si riferisce a un anticorpo comprendente regioni variabili di scimmia e regioni costanti umane. I metodi per produrre anticorpi primatizzati sono noti nel ramo. Vedere, per esempio, Brevetti statunitensi nn. 5,658,570; 5,681,722; e 5,693,780.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-TNF α sono anticorpi derivatizzati. Per esempio, gli anticorpi derivatizzati che sono stati modificati, per esempio, da glicosilazione, acetilazione, pegilazione, fosforilazione, ammidazione, derivatizzazione da parte di gruppi protettivi/bloccanti noti, clivaggio proteolitico, collegamento a un ligando cellulare o altra proteina (vedere di seguito per una discussione sui coniugati anticorpali), ecc. Una qualsiasi delle numerose modifiche chimiche può essere eseguita mediante tecniche note, inclusi, in via non limitativa, clivaggio chimico specifico, acetilazione, formilazione, sintesi metabolica della tunicamicina,

ecc. Inoltre, il derivato può contenere uno o più amminoacidi non classici.

In ancora altri aspetti, un anticorpo anti-TNF α ha uno o più amminoacidi inseriti in una o più delle sue regioni ipervariabili, per esempio come descritto in US 2007/0280931.

Coniugati anticorpali

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-TNF α sono coniugati anticorpali che vengono modificati, per esempio, dal fissaggio covalente di qualsiasi tipo di molecola all'anticorpo, in modo tale che il fissaggio covalente non interferisca con il legame a TNF α . Tecniche per coniugare frazioni effettrici ad anticorpi sono ben note nel ramo (vedere, per esempio, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., A pp. 623-53 (Robinson et al., Eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58 e Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

In un esempio, l'anticorpo o il relativo frammento è fuso tramite un legame covalente (per esempio, un legame peptidico), in corrispondenza dell'N-terminale o del C-terminale, a una sequenza amminoacidica di un'altra proteina (o di una relativa porzione; preferibilmente almeno una porzione di 10,

20 o 50 amminoacidi della proteina). Preferibilmente, l'anticorpo o il relativo frammento è legato all'altra proteina in corrispondenza dell'N-terminale del dominio costante dell'anticorpo. Le procedure del DNA ricombinante possono essere usate per creare tali fusioni, per esempio come descritto in WO 86/01533 e EP0392745. In un altro esempio, la molecola effettrice può aumentare l'emivita in vivo. Esempi di molecole effettrici adatte di questo tipo includono polimeri, albumina, proteine leganti l'albumina o composti leganti l'albumina come quelli descritti in WO 2005/117984.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-TNF α possono essere fissati a frazioni di poli(etilenglicole) (PEG). Per esempio, se l'anticorpo è un frammento di anticorpo, le frazioni PEG possono essere fissate tramite qualsiasi gruppo funzionale amminoacidico della catena laterale o terminale dell'amminoacido disponibile situato nel frammento dell'anticorpo, per esempio qualsiasi gruppo ammino, immino, tiolo, idrossile o carbossile libero. Tali amminoacidi possono essere presenti naturalmente nel frammento di anticorpo o possono essere ingegnerizzati nel frammento usando metodi del DNA ricombinante. Vedere, per esempio, il Brevetto statunitense n.

5,219,996. È possibile usare molteplici siti per fissare due o più molecole di PEG. Preferibilmente le frazioni di PEG sono legate in modo covalente attraverso un gruppo tiolico di almeno un residuo di cisteina situato nel frammento di anticorpo. Quando un gruppo tiolo viene usato come punto di fissaggio, possono essere usate frazioni effettrici opportunamente attivate, per esempio derivati selettivi del tiolo come maleimmidi e derivati della cisteina.

In un altro esempio, un coniugato di anticorpo anti-TNF α è un frammento Fab' modificato che è PEGilato, vale a dire ha PEG (poli(etilenglicole)) covalentemente fissato ad esso, per esempio, secondo il metodo descritto in EP0948544. Vedere anche Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris e S. Zalipsky, ed., American Chemical Society, Washington D. C, 1997); e Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam e A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); e Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531- 545.

Composizioni farmaceutiche e trattamento

Il trattamento di una malattia racchiude il trattamento di pazienti a cui è già stata diagnosticata una qualsiasi forma della malattia in qualsiasi fase o manifestazione clinica; il ritardo dell'insorgenza o dell'evoluzione o l'aggravamento o il deterioramento dei sintomi o dei segni della malattia; e/o prevenire e/o ridurre la gravità della malattia.

Un "soggetto" o "paziente" a cui viene somministrato un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale può essere un mammifero, come un non primate (per esempio, mucca, maiale, cavallo, gatto, cane, ratto, ecc.) o un primate (per esempio, scimmia o umano). Per determinati aspetti, l'essere umano è un paziente pediatrico. In altri aspetti, l'essere umano è un paziente adulto.

Nella presente sono descritte composizioni comprendenti un anticorpo anti-TNF α e, facoltativamente, uno o più agenti terapeutici aggiuntivi, come i secondi agenti terapeutici descritti di seguito. Le composizioni sono tipicamente fornite come parte di una composizione farmaceutica sterile che include un veicolo farmaceuticamente accettabile. Questa composizione può essere in una

qualsiasi forma adatta (a seconda del metodo di somministrazione desiderato a un paziente).

Gli anticorpi anti-TNF α e i frammenti funzionali possono essere somministrati a un paziente mediante una varietà di vie come per via orale, transdermica, sottocutanea, intranasale, endovenosa, intramuscolare, intratecale, topica o locale. La via più adatta per la somministrazione in ogni dato caso dipenderà dal particolare anticorpo, dal soggetto, dalla natura e dalla gravità della malattia e dalle condizioni fisiche del soggetto. Tipicamente, un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale verrà somministrato per via endovenosa.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione viene somministrato per via orale. Se la somministrazione avviene per via orale, il frammento funzionale è preferibilmente un anticorpo a catena singola (scFv), diabody o IgG.

In forme di realizzazione tipiche, un anticorpo anti-TNF α o un frammento funzionale è presente in una composizione farmaceutica a una concentrazione sufficiente per consentire la somministrazione endovenosa da 0,5 mg/kg di peso corporeo a 20 mg/kg di peso corporeo. In alcune forme di realizzazione, la

concentrazione di anticorpo o frammento adatto per l'uso nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente include 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg o una concentrazione che varia tra i valori precedenti, per esempio, da 1 mg/kg a 10 mg/kg, da 5 mg/kg a 15 mg/kg o da 10 mg/kg a 18 mg/kg.

La dose efficace di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale può variare da circa 0,001 a circa 750 mg/kg per singola somministrazione (per esempio, bolo), somministrazioni multiple o somministrazione continua, o per raggiungere una concentrazione sierica di 0,01-5000 μ g/ml di concentrazione sierica per somministrazione singola (per esempio bolo), somministrazioni multiple o somministrazione continua, o qualsiasi intervallo o valore efficace in essa a seconda della condizione da trattare, della via di somministrazione e dell'età, peso e condizioni del soggetto. In determinate forme di realizzazione, ciascuna dose può variare da circa 0,5 mg a circa 50 mg per chilogrammo di peso corporeo o da circa 3 mg a circa 30 mg per chilogrammo di peso

corporeo. L'anticorpo può essere formulato come una soluzione acquosa.

Le composizioni farmaceutiche possono essere convenientemente presentate in forme di dose unitaria contenenti una quantità predeterminata di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale per dose. Tale unità può contenere da 0,5 mg a 5 g, per esempio, in via non limitativa, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg o qualsiasi intervallo tra due qualsiasi dei valori precedenti, per esempio da 10 mg a 1000 mg, da 20 mg a 50 mg o da 30 mg a 300 mg. I veicolanti farmaceuticamente accettabili possono assumere un'ampia varietà di forme a seconda, per esempio, della condizione da trattare o della via di somministrazione.

La determinazione del dosaggio efficace, del numero totale di dosi e della durata del trattamento di un anticorpo anti-TNF α o di un relativo frammento funzionale rientra nelle capacità degli esperti del ramo e può essere determinata usando uno studio di incremento della dose standard.

Le formulazioni terapeutiche degli anticorpi anti-TNF α e dei frammenti funzionali adatti nei metodi descritti nella presente possono essere preparate per

la conservazione come formulazioni liofilizzate o soluzioni acquose mescolando l'anticorpo avente il grado di purezza desiderato con veicolanti, eccipienti o stabilizzanti farmaceuticamente accettabili facoltativi tipicamente impiegati nel ramo (che sono tutti nella presente indicati come "veicolanti"), vale a dire agenti tamponanti, agenti stabilizzanti, conservanti, isotonificanti, detergenti non ionici, antiossidanti e altri additivi vari. Vedere, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edizione (Osol, ed. 1980). Tali additivi devono essere atossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegate.

Gli agenti tampone aiutano a mantenere il pH nell'intervallo che si avvicina alle condizioni fisiologiche. Possono presentarsi a concentrazioni che variano da circa 2 mM a circa 50 mM. Agenti tampone adatti includono acidi sia organici che inorganici e relativi sali come tamponi citrato (per esempio, miscela citrato monosodico-citrato disodico, miscela acido citrico-citrato trisodico, miscela acido citrico-citrato monosodico, ecc.), tamponi di succinato (per esempio, miscela acido succinico-succinato monosodico, miscela acido succinico-idrossido di sodio, miscela acido succinico-succinato

disodico, ecc.), tamponi di tartrato (per esempio miscela acido tartarico-tartrato di sodio, miscela acido tartarico-tartrato di potassio, miscela acido tartarico-idrossido di sodio, ecc.), tamponi di fumarato (per esempio, miscela acido fumarico-fumarato monosodico, miscela acido fumarico-fumarato disodico, miscela fumarato monosodico-fumarato disodico, ecc.), tamponi di gluconato (per esempio, miscela acido gluconico-gluconato di sodio, miscela di acido gluconico-idrossido di sodio, miscela di acido gluconico-gluconato di potassio, ecc.), tampone di ossalato (per esempio, miscela di acido ossalico-ossalato di sodio, miscela di acido ossalico-idrossido di sodio, miscela di acido ossalico-ossalato di potassio, ecc.), tamponi di lattato (per esempio miscela di acido lattico-lattato di sodio, miscela di acido lattico-idrossido di sodio, miscela di acido lattico-lattato di potassio, ecc.) e tamponi di acetato (per esempio miscela di acido acetico-acetato di sodio, miscela di acido acetico-idrossido di sodio, eccetera.). Inoltre, possono essere usati tamponi di fosfato, tamponi di istidina e sali di trimetilammina come Tris.

I conservanti possono essere aggiunti per ritardare la crescita microbica e possono essere

aggiunti in quantità comprese tra 0,2% e 1% (p/v). Conservanti adatti includono fenolo, alcool benzilico, meta-cresolo, metil parabene, propil paraben, ottadecildimetilbenzil ammonio cloruro, alogenuri di benzalconio (per esempio, cloruro, bromuro e ioduro), cloruro di esametonio e alchil parabeni come metil o propil parabene, catecolo, resorcinolo, cicloesanol e 3-pentanol. Isotonicificanti talvolta noti come "stabilizzanti" possono essere aggiunti per garantire l'isotonicità delle composizioni liquide e includono alcoli di zucchero poliidrici, preferibilmente alcoli di zucchero triidrici o superiori, come glicerina, eritritolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo e mannitolo. Gli stabilizzanti si riferiscono a un'ampia categoria di eccipienti che possono variare in funzione da un agente di carica a un additivo che solubilizza l'agente terapeutico o aiuta a prevenire la denaturazione o l'adesione alla parete del contenitore. Tipici stabilizzanti possono essere alcoli di zucchero poliidrici (elencati sopra); amminoacidi come arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, istidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, acido glutammico, treonina, ecc., zuccheri organici o alcoli di zucchero, come lattosio, trealosio, stachiosio, mannitolo, sorbitolo, xilitolo, ribitolo, mioinositolo,

galattitolo, glicerolo e simili, inclusi ciclitoli come inositolo; polietilen glicole; polimeri di amminoacidi; agenti riducenti contenenti zolfo, come urea, glutatione, acido tiottico, tioglicolato di sodio, tioglicerolo, α -monotioglicerolo e tio solfato di sodio; polipeptidi a basso peso molecolare (per esempio, peptidi con 10 residui o meno); proteine come albumina di siero umano, albumina di siero bovino, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili, come monosaccaridi di polivinilpirrolidone, come xilosio, mannosio, fruttosio, glucosio; disaccaridi come lattosio, maltosio, saccarosio e trisaccaridi come raffiniosio; e polisaccaridi come destrano. Gli stabilizzanti possono essere presenti nell'intervallo da 0,1 a 10.000 pesi per parte di proteina attiva in peso.

È possibile aggiungere tensioattivi non ionici o detergenti (noti anche come "agenti umettanti") per aiutare a solubilizzare l'agente terapeutico e per proteggere la proteina terapeutica dall'aggregazione indotta dall'agitazione, che consente anche alla formulazione di essere esposta a sollecitazioni superficiali di taglio senza provocare denaturazione della proteina. Tensioattivi non ionici adatti includono polisorbati (20, 80, ecc.), poliossameri

(184, 188 ecc.), polioli Pluronic, poliossietilen sorbitano monoeteri (TWEEN®-20, TWEEN®-80, ecc.). I tensioattivi non ionici possono essere presenti in un intervallo da circa 0,05 mg/ml a circa 1,0 mg/ml, o in un intervallo da circa 0,07 mg/ml a circa 0,2 mg/ml.

Altri eccipienti vari includono agenti di carica (per esempio, amido), agenti chelanti (per esempio, EDTA), antiossidanti (per esempio, acido ascorbico, metionina, vitamina E), inibitori delle proteasi e co-solventi.

La formulazione nel presente contesto può anche contenere un secondo agente terapeutico oltre a un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale. Di seguito vengono forniti esempi di secondi agenti terapeutici adatti.

Il programma di dosaggio può variare da una volta al mese a giornalmente a seconda di una serie di fattori clinici, tra cui il tipo di malattia, la gravità della malattia e la sensibilità del paziente all'anticorpo anti-TNF α o al frammento funzionale. In forme di realizzazione specifiche, un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale viene somministrato giornalmente, due volte a settimana, tre volte a settimana, a giorni alterni, ogni 5 giorni, ogni 10 giorni, ogni due settimane, ogni tre settimane,

ogni quattro settimane o una volta al mese o in qualsiasi intervallo tra due qualsiasi dei valori precedenti, per esempio da ogni quattro giorni a ogni mese, da ogni 10 giorni a ogni due settimane o da due a tre volte a settimana, ecc.

Il dosaggio di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale da somministrare varierà in base al particolare anticorpo, al soggetto e alla natura e gravità della malattia, alle condizioni fisiche del soggetto, al regime terapeutico (per esempio, se viene usato un secondo agente terapeutico) e la via di somministrazione selezionata; il dosaggio appropriato può essere facilmente determinato da una persona esperta nel ramo.

Sarà riconosciuto da un esperto del ramo che la quantità ottimale e il distanziamento dei singoli dosaggi di un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale saranno determinati dalla natura e dall'entità della condizione da trattare, dalla forma, dal percorso e dal sito di somministrazione, e dall'età e dalle condizioni del particolare soggetto trattato e che un medico determinerà in ultima analisi i dosaggi appropriati da usare. Questo dosaggio può essere ripetuto tutte le volte che è opportuno. Se si sviluppano effetti collaterali, la quantità e/o la

frequenza del dosaggio possono essere alterati o ridotta, in accordo con la normale pratica clinica.

Disturbi da trattare

L'invenzione si riferisce a un metodo per trattare o prevenire una malattia umana correlata a TNF α in un soggetto, comprendente somministrare al soggetto l'anticorpo o il frammento funzionale come definito nella presente. Il termine "disturbo correlato a TNF α " o "malattia correlata a TNF α " si riferisce a qualsiasi disturbo, insorgenza, progressione o persistenza dei sintomi o degli stati patologici che richiedono la partecipazione di TNF α . Disturbi esemplificativi correlati a TNF α includono stati di infiammazione cronici e/o autoimmuni in generale, disturbi infiammatori immuno-mediati in generale, malattia infiammatoria del SNC, malattie infiammatorie che interessano l'occhio, le articolazioni, la pelle, le mucose, il sistema nervoso centrale, il tratto gastrointestinale, il tratto urinario o polmone, stati di uveite in generale, retinite, uveite HLA-B27+, morbo di Behçet, sindrome dell'occhio secco, glaucoma, sindrome di Sjögren, diabete mellito (inclusa neuropatia diabetica), insulino-resistenza, stati di artrite in generale, artrite reumatoide, osteoartrosi, artrite reattiva e

sindrome di Reiter, artrite giovanile, spondilite anchilosante, sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barré, miastenia grave, sclerosi laterale amiotrofica, sarcoidosi, glomerulonefrite, nefropatia cronica, cistite, psoriasi (inclusa artrite psoriasica), idradenite suppurativa, pannicolite, pioderma gangrenoso, sindrome SAPHO (sinovite, acne, pustolosi, iperostosi e osteite), acne, sindrome di Sweet, pemfigo, morbo di Crohn (incluse manifestazioni extraintestinali), colite ulcerosa, asma bronchiale, polmonite da ipersensibilità, allergie generali, rinite allergica, sinusite allergica, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), fibrosi polmonare, granulomatosi di Wegener, sindrome di Kawasaki, arterite a cellule giganti, vasculite di Churg-Strauss, poliarterite nodale, ustioni, malattia del trapianto contro l'ospite, reazioni dell'ospite contro il trapianto, episodi di rigetto a seguito di trapianto di organi o midollo osseo, stati sistemici e locali di vasculite in generale, lupus eritematoso sistemico e cutaneo, polimiosite e dermatomiosite, sclerodermia, preeclampsia, pancreatite acuta e cronica, epatite virale, epatite alcolica, infiammazione post-chirurgica come dopo un intervento chirurgico agli occhi (per esempio cataratta

(sostituzione del cristallino) o intervento chirurgico al glaucoma), chirurgia articolare (inclusa chirurgia artroscopica), chirurgia in corrispondenza di strutture legate alle articolazioni (per esempio legamenti), chirurgia orale e/o dentale, procedure cardiovascolari minimamente invasive (per esempio PTCA, aterectomia, posizionamento di stent), procedure intra-addominali e ginecologiche laparoscopiche e/o endoscopiche, procedure urologiche endoscopiche (per esempio chirurgia prostatica, ureterosopia, cistoscopia, cistite interstiziale) o infiammazione perioperatoria (prevenzione) in generale, dermatite bollosa, dermatite neutrofila, necrolisi epidermica tossica, dermatite pustolosa, malaria cerebrale, sindrome emolitica uremica, rigetto dell'allotrapianto, otite media, morso di serpente, eritema nodoso, sindromi mielodisplastiche, colangite sclerosante primaria, spondiloarteropatia sieronegativa, anemia ematolitica autoimmune, granulamatosi orofacciale, piostomatite vegetale, stomatite aftosa, lingua geografica, stomatite migratoria, morbo di Alzheimer e morbo di Parkinson, paralisi di Bell, morbo di Creutzfeld-Jakob e condizioni neuro-degenerative in generale.

Osteolisi correlata al cancro, infiammazione

correlata al cancro, dolore correlato al cancro, cachessia correlata al cancro, metastasi ossee, forme acute e croniche di dolore, indipendentemente dal fatto che siano causate da effetti centrali o periferici di TNF α e dal fatto che siano classificate come forme infiammatorie, nocicettive o neuropatiche di dolore, sciatica, lombalgia, sindrome del tunnel carpale, sindrome del dolore regionale complesso (CRPS), gotta, nevralgia postherpetica, fibromialgia, stati dolorosi locali, sindromi dolorose croniche dovute a tumore metastatico, dismenorrea.

Particolari disturbi da trattare includono stati di artrite in generale, artrite reumatoide, artrosi, artrite reattiva, artrite giovanile; psoriasi inclusa artrite psoriasica; malattia infiammatoria intestinale, inclusa la malattia di Crohn, colite ulcerosa inclusa proctite, sigmoidite, colite del lato sinistro, colite estesa e pancolite, colite indeterminata, colite microscopica incl. colite collagenosa e linfocitica, colite nella malattia del tessuto connettivo, colite da diversione, colite nella malattia diverticolare, colite eosinofila e pouchite.

Più preferibilmente, l'anticorpo o il frammento funzionale dell'invenzione viene usato per trattare una malattia infiammatoria intestinale, in particolare

morbo di Crohn, colite ulcerosa o colite microscopica. Il morbo di Crohn può essere morbo di Crohn superiore ileale, colonico, ileocolonico o isolato (gastrico, duodenale e/o digiunale), inclusi comportamenti non restrittivi/non penetranti, restrittivi, penetranti e perianali, consentendo qualsiasi combinazione di localizzazione e comportamento della malattia di uno qualsiasi dei suddetti. La colite ulcerosa può essere proctite ulcerosa, proctosigmoidite, colite del lato sinistro, colite panulcerosa e pouchite.

Terapia di combinazione e altri aspetti

Preferibilmente, il paziente che viene trattato con un anticorpo anti-TNF α o un relativo frammento funzionale viene anche trattato con un altro medicinale convenzionale. Per esempio, un paziente affetto da malattia infiammatoria intestinale, soprattutto se affetto da malattia da moderata a grave, viene tipicamente anche trattato con mesalazina o suoi derivati o profarmaci, corticosteroidi, per esempio budesonide o prednisolone (orale o e.v.), immunosoppressori, per esempio azatioprina/6-mercaptopurina (6-MP) o metotrexato, ciclosporina o tacrolimus. Altri medicinali che possono essere somministrati contemporaneamente al paziente includono farmaci biologici come infliximab, adalimumab,

etanercept, certolizumab pegol o altri. Ulteriori farmaci che possono essere somministrati contemporaneamente al paziente includono immunosoppressori (per esempio, azatioprina/6-MP o metotrexato o ciclosporina orale) al fine di mantenere una remissione stabile e più lunga. Ancora un altro aspetto dell'invenzione è l'uso di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale come definito sopra per ridurre l'infiammazione.

Ancora un altro aspetto dell'invenzione è un anticorpo anti-TNF α o un frammento funzionale come definito sopra per l'uso per ridurre l'infiammazione in un paziente affetto da una condizione infiammatoria.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione è un metodo per trattare una condizione infiammatoria, comprendente somministrare a un paziente che ne ha necessità una quantità efficace di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale come definito sopra. La condizione infiammatoria è preferibilmente una delle condizioni sopra descritte.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione è un metodo per prevenire una condizione infiammatoria, comprendente somministrare a un paziente che ne ha necessità una quantità efficace di un anticorpo anti-TNF α o di un frammento funzionale come definito sopra.

La condizione infiammatoria è preferibilmente una delle condizioni sopra descritte.

Tabella 1. Riepilogo delle sequenze amminoacidiche

SEQ ID NO:	Descrizione
1	L1 CDR generica
2	L2 CDR generica
3	L3 CDR generica
4	H1 CDR generica
5	H2 CDR generica
6	H3 CDR generica
7	L1 CDR del clone 16-22-H05
8	L2 CDR del clone 16-22-H05 e del clone 16-16-H10
9	L3 CDR del clone 16-22-H05 e del clone 16-16-H10
10	H1 CDR del clone 16-22-H05, clone 16-16-B08 e clone 16-16-H10
11	H2 CDR del clone 16-22-H05
12	H3 CDR del clone 16-22-H05
13	V _H di scFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc02 e del clone 16-22-H05-sc04
14	V _L di scFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc02
15	ScFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc02
16	L1 CDR del clone 16-12-B11
17	L1 CDR del clone 16-13-C08
18	L1 CDR del clone 16-13-E05
19	L1 CDR del clone 16-16-B08
20	L1 CDR del clone 16-16-H10
21	L1 CDR del clone 17-13-G07
22	L1 CDR del clone 17-20-E06
23	L2 CDR del clone 16-12-B11, clone 16-16-B08 e clone 17-13-G07
24	L2 CDR del clone 16-13-C08
25	L2 CDR del clone 16-13-E05
26	L2 CDR del clone 17-20-E06
27	L3 CDR del clone 16-12-B11
28	L3 CDR del clone 16-13-C08
29	L3 CDR del clone 16-13-E05
30	L3 CDR del clone 16-16-B08
31	L3 CDR del clone 17-13-G07
32	L3 CDR del clone 17-20-E06
33	H1 CDR del clone 16-12-B11 e del clone 16-13-E05
34	H1 CDR del clone 16-13-C08
35	H1 CDR del clone 17-13-G07
36	H1 CDR del clone 17-20-E06
37	H2 CDR del clone 16-12-B11 e del clone 17-13-G07
38	H2 CDR del clone 16-13-C08
39	H2 CDR del clone 16-13-E05
40	H2 CDR del clone 16-16-B08 e del clone 17-20-E06
41	H2 CDR del clone 16-16-H10
42	H3 CDR del clone 16-12-B11
43	H3 CDR del clone 16-13-C08

SEQ ID NO:	Descrizione
44	H3 CDR del clone 16-13-E05
45	H3 CDR del clone 16-16-B08
46	H3 CDR del clone 16-16-H10
47	H3 CDR del clone 17-13-G07
48	H3 CDR del clone 17-20-E06
49	Sequenza linker in scFv
50	Sequenza linker in diabody
51	Diabody umanizzato del clone 16-22-H05
52	Catena leggera di IgG umanizzata del clone 16-22-H05
53	Catena pesante di IgG umanizzata del clone 16-22-H05
54	V _L di scFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc04
55	ScFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc04
56	Sequenza di consenso Vk1 della cornice I (posizioni di Kabat 1-23)
57	Sequenza di consenso Vk1 della cornice II (posizioni di Kabat 35-49)
58	Sequenza di consenso Vk1 della cornice III (posizioni di Kabat 57-88)
59	Sequenza basata sulla linea germinale VA della cornice IV (vedere Tabella 16)
60	Sequenza basata sulla linea germinale VA della cornice IV (vedere Tabella 16)
61	Sequenza basata sulla linea germinale VA della cornice IV (vedere Tabella 16)
62	Sequenza basata sulla linea germinale VA della cornice IV (vedere Tabella 16)

Esempi

Esempio 1: Generazione di anticorpi di coniglio diretti contro TNF α umano

1. Risultati

1.1 Immunizzazione

I conigli sono stati immunizzati con TNF α umano ricombinante purificato (Peprotech, Cat. N. 300-01A). Durante il corso dell'immunizzazione, la forza della risposta immunitaria umorale contro l'antigene è stata valutata qualitativamente determinando la diluizione massima (titolo) per il siero di ciascun coniglio che produceva ancora un legame rilevabile degli anticorpi

sierici policlonali all'antigene. I titoli anticorpali sierici contro TNF α umano ricombinante immobilizzato sono stati valutati usando un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA, vedere 2.2.1). Tutti e tre i conigli mostravano titoli molto alti con una diluizione 10×10^6 volte del siero avendo come risultato ancora un segnale positivo (almeno 3 volte superiore al segnale ottenuto con il siero di un animale naïve non imparentato che è stato usato come controllo di fondo) nell'ELISA. Inoltre, la capacità di differenti sieri di coniglio di inibire l'attività biologica di TNF α è stata valutata usando un saggio basato su cellule L929 di topo (vedere 2.2.3). Tutti e tre i sieri hanno inibito l'apoptosi indotta da TNF α dei fibroblasti L929 di topo. Il coniglio #3 mostrava la più forte attività neutralizzante con il 50% di inibizione (IC₅₀) raggiunta a una diluizione sierica di 1:155'000. Rispetto al coniglio #3, il coniglio #2 e il coniglio #1 mostravano un'attività inferiore di circa 3 e 21 volte, raggiungendo l'inibizione del 50% a una diluizione sierica di 1:55'500 e 1:7'210, rispettivamente.

I linfociti isolati dalle milze di tutti e tre gli animali sono stati selezionati per le successive procedure di identificazione del colpo. Agli animali è

stata assegnata la priorità in base alla potenza di inibire l'attività biologica di TNF α nel saggio L929. Pertanto, il numero più alto di hit coltivati proveniva dal coniglio #3 e il numero più basso di hit derivava dal coniglio #1.

1.2 Identificazione di hit

1.2.1 Ordinamento di hit

Prima della procedura di identificazione di hit, è stata sviluppata una procedura di sorting basata su citometria a flusso che rileva e consente in modo specifico l'isolamento di cellule B che legano TNF α ad alta affinità (vedere 2.1).

Un totale di 33×10^6 linfociti (corrispondenti all'1,5% dei linfociti totali isolati) derivati da tutti e tre i conigli sono stati caratterizzati in due campagne di sorting indipendenti. Delle 33×10^6 cellule analizzate in totale sono state isolate 3452 cellule B che esprimono anticorpi specifici per TNF α (IgG). Il numero di linfociti clonati era differente per i tre conigli, poiché più cellule sono state isolate da quei conigli i cui sieri mostravano una forte inibizione di TNF α nel saggio L929. Delle cellule B isolate, 792 cloni sono stati derivati dal coniglio #1, 1144 cloni dal coniglio #2 e 1408 cloni dal coniglio #3. Per 108 cloni il rispettivo coniglio

di origine non è noto, poiché derivano da una miscela di linfociti residui di tutti e 3 i conigli per consentire il recupero ottimale di piccole quantità di linfociti dalle fiale.

1.2.2 Screening di hit

I risultati ottenuti durante la fase di screening si basano su saggi effettuati con anticorpi non purificati da supernatanti di coltura di cellule secernenti anticorpi (ASC, Antibody Secreting Cell), poiché la scala della coltura ad alto rendimento non consente la purificazione dei singoli anticorpi di coniglio. Tali supernatanti sono stati usati per classificare un gran numero di anticorpi l'uno rispetto all'altro, tuttavia non per fornire valori assoluti (per esempio per l'inibizione dell'attività biologica di $\text{TNF}\alpha$), ad eccezione dell'affinità di legame. I supernatanti ASC sono stati esaminati in un ELISA ad alto rendimento per il legame a $\text{TNF}\alpha$ umano ricombinante. I supernatanti leganti $\text{TNF}\alpha$ sono stati ulteriormente caratterizzati per il legame a $\text{TNF}\alpha$ di scimmia *Cynomolgus* mediante ELISA, la cinetica di legame e per il loro potenziale di neutralizzare l'attività biologica di $\text{TNF}\alpha$ umano nel saggio L929. Ad eccezione della cinetica di legame, i valori di rapporto degli screening ad alto rendimento devono

essere interpretati come risposte "sì" o "no", essendo basati su misurazioni a punto singolo (nessuna dose-risposta). L'affinità con TNF α di scimmia *Cynomolgus* e topo è stata analizzata per tutti i 102 cloni selezionati per l'amplificazione e il sequenziamento dei domini variabili di catene pesanti e leggere dell'anticorpo.

1.2.2.1 Legame a TNF α umano

Lo scopo dello screening primario è identificare i cloni ASC che producono anticorpi specifici per TNF α umano. A tale scopo, i supernatanti di colture cellulari di 3452 cloni ASC sono stati analizzati per la presenza di anticorpi verso TNF α umano mediante ELISA (vedere 2.2.1). Il metodo ELISA usato valuta la "quantità" di anticorpi del sottotipo IgG legati a TNF α umano ricombinante, non fornisce tuttavia informazioni circa l'affinità o la concentrazione degli anticorpi. In questo saggio, i supernatanti di 894 cloni ASC producevano un segnale che era chiaramente al di sopra del fondo. Il tasso di hit nello screening è stato simile per il coniglio #1 e il coniglio #2 con 153 hit su 792 (19,3%) identificati dal coniglio #1 e 225 hit su 1144 identificati dal coniglio #2 (19,7%). Il coniglio #3 mostrava un tasso di hit significativamente più alto del 34,4%, con

l'identificazione di 484 hit su 1408. Tutti gli 894 hit identificati in questo screening primario, sono stati sottoposti alla misurazione della cinetica di legame mediante SPR (screening secondario).

1.2.2.2 Cinetica di legame a TNF α

Lo scopo dello screening secondario è quello di ottenere informazioni quantitative sulla qualità del legame ai bersagli per ogni hit dallo screening primario mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR, vedere 2.2.2). A differenza dell'ELISA usato durante lo screening primario, questo metodo valuta la cinetica del legame ai bersagli in funzione del tempo. Ciò consente la determinazione delle costanti di velocità per l'associazione (k_a) e la dissociazione (k_d) dell'anticorpo dal suo bersaglio. Il rapporto k_d/k_a fornisce la costante di dissociazione all'equilibrio (K_D), che riflette l'affinità di un anticorpo al suo bersaglio. Degli 894 hit identificati nello screening primario, è stato possibile determinare le affinità di legame a TNF α umano per 839 anticorpi monoclonali di coniglio. Per i restanti 55 anticorpi non è stato possibile misurare l'affinità poiché la concentrazione di anticorpi nel supernatante ASC era inferiore al limite di rilevamento dello strumento SPR nella rispettiva configurazione. Gli 839 anticorpi anti-TNF α

che è stato possibile misurare mostravano costanti di dissociazione (K_D) che variano da meno di $1,36 \times 10^{-13}$ M a $1,14 \times 10^{-8}$ M. Il 69% di tutti gli anticorpi analizzati aveva una K_D inferiore a 0,5 nM.

Le K_D mediane di $2,21 \times 10^{-10}$ M e $2,09 \times 10^{-10}$ M per gli hit di screening identificati dai conigli #2 e #3 erano simili mentre il coniglio #1 mostrava valori circa 2 volte più alti con una K_D mediana di $4,65 \times 10^{-10}$ M. Considerando soltanto gli hit di screening neutralizzanti, le distribuzioni di affinità erano simili per tutti e tre gli animali con valori più bassi per la K_D mediana (K_D mediane tra $1,4 \times 10^{-10}$ M e $1,27 \times 10^{-10}$ M). Le affinità inferiori a 0,041 nM, 0,029 nM e 0,026 nM sono state misurate per il 5% degli hit di screening rispettivamente per i conigli #1, #2 e #3. Per il 2% dei supernatanti, le affinità erano anche nell'intervallo picomolare basso (inferiore a 6,2 pM, 7,9 pM e 11 pM). L'eccellente resa di anticorpi ad alta affinità risultante dallo screening secondario fornisce un'ampia base per la selezione degli anticorpi più appropriati per l'umanizzazione e la riformattazione.

1.2.2.3 Potenza

Per la valutazione della potenza, è stato sviluppato un saggio basato su cellule (saggio L929)

(vedere 2.2.3). 506 degli 894 anticorpi selezionati (56,6%) inibivano l'apoptosi indotta da TNF α nel saggio L929 di oltre il 50%. In linea con i risultati ottenuti durante l'analisi del titolo, la percentuale più alta di hit neutralizzanti è stata ricavata dal coniglio #3 con un tasso di hit del 62,8%, seguito dal coniglio #2 con un tasso di hit del 56,4% e dal coniglio #1 con il tasso di hit più basso del 39,9%. Le affinità di questi anticorpi neutralizzanti variavano tra $1,36 \times 10^{-13}$ e $1,19 \times 10^{-9}$ M.

1.2.2.4 Reattività incrociata tra specie (scimmia Cynomolgus)

Tutti gli 894 hit identificati nello screening primario sono stati analizzati per la reattività incrociata delle specie a TNF α di scimmia Cynomolgus mediante ELISA (vedere 2.2.1). Lo scopo di questo screening aggiuntivo era consentire la selezione di cloni ASC noti per la reazione incrociata con TNF α di scimmia Cynomolgus. Il metodo ELISA usato valuta la "quantità" di anticorpi del sottotipo IgG legati a TNF α di scimmia Cynomolgus ricombinante, non fornisce tuttavia informazioni circa l'affinità o la concentrazione degli anticorpi. I supernatanti da 414 (46%) cloni ASC producevano un segnale chiaro (densità ottica (OD, Optical Density) ≥ 1). La percentuale di

hit con reattività incrociata a TNF α di scimmia Cynomolgus era simile per il coniglio #1 e il coniglio #3 con 81 hit su 153 (52,9%) identificati dal coniglio #1 e 236 hit su 484 identificati dal coniglio #3 (48,8%). Con il 37,8%, il coniglio #2 mostrava una percentuale leggermente inferiore di hit con reattività incrociata risultante nell'identificazione di 82 hit su 225.

1.2.2.5 Selezione di cloni per RT-PCR

Come prerequisito per la conferma dell'hit, l'analisi della sequenza genica e la successiva umanizzazione degli anticorpi di coniglio, è necessario recuperare le informazioni genetiche che codificano il dominio variabile dell'anticorpo di coniglio. Ciò è stato effettuato mediante trascrizione inversa (RT) del rispettivo RNA messaggero nel DNA complementare (cDNA), seguita dall'amplificazione del DNA a doppio filamento mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR). La selezione dei cloni ASC sottoposti a RT-PCR si basava principalmente sull'affinità e sull'attività neutralizzante. Come criterio aggiuntivo è stata considerata la reattività incrociata a TNF α di scimmia Cynomolgus. In totale sono stati selezionati 102 cloni ASC per il clonaggio genico mediante RT-PCR. In primo luogo, sono stati

selezionati i 93 migliori ASC (in termini di affinità) con un K_D inferiore a 80 pM, che inibivano l'attività biologica di TNF α nel saggio L929 di oltre il 50% e che mostravano un legame significativo a TNF α di scimmia *Cynomolgus*. Inoltre, sono stati selezionati anche tutti i 9 cloni ASC con il punteggio migliore con K_D inferiore a 20 pM che neutralizzavano l'attività di TNF α di oltre il 50% ma non si legavano a TNF α di scimmia *Cynomolgus*. In totale, 12, 13 e 66 cloni ASC sono stati amplificati con successo e sequenziati rispettivamente dai conigli #1, #2 e #3.

1.2.2.6 Identificazione di cloni correlati con proprietà desiderate

Al fine di caratterizzare la diversità genetica del pannello di cloni ASC isolati, le sequenze delle regioni determinanti complementari (CDR) sono state estratte e sottoposte a un allineamento di sequenze multiple permettendo così il raggruppamento delle sequenze in un albero filogenetico.

Sebbene questa analisi da un lato consenta la selezione di un insieme diversificato di sequenze clonali da portare avanti in esperimenti di umanizzazione e riformattazione, identifica anche cluster omologhi di sequenze clonali che sembravano condividere un clone di cellule B parentale comune nel

coniglio. Il segno distintivo di questi cluster di sequenza è l'omologia di sequenza elevata nelle CDR e uno schema coerente di proprietà farmacodinamiche. Entrambe queste caratteristiche sono riassunte per un cluster di otto cloni nelle tabelle 2 e 3. Nonostante la conservazione funzionale di questo cluster di sequenze, la sequenza consensus nella Tabella 3 rivela che una certa variabilità delle CDR è tollerata, pur risultando nel profilo farmacodinamico desiderato.

Tabella 2: Proprietà farmacodinamiche degli anticorpi monoclonali nei supernatanti ASC..

ASC SN	Affinità a TNF α umano			Affinità a TNF α di Cynomolgus			Saggio L929, % inib.
	ID del Clone	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	
16-12-B11	3,22E+06	1,87E-04	5,82E-11	2,15E+06	1,37E-03	6,34E-10	71
16-13-C08	1,77E+06	9,41E-05	5,33E-11	1,80E+06	1,77E-04	9,82E-11	93
16-13-E05	2,78E+06	8,27E-05	2,97E-11	2,53E+06	2,99E-04	1,18E-10	94
16-16-B08	2,27E+06	4,53E-05	1,99E-11	2,35E+06	1,52E-04	6,45E-11	73
16-16-H10	2,03E+06	1,59E-04	7,85E-11	2,20E+06	4,61E-04	2,10E-10	70
16-22-H05	1,90E+06	7,26E-05	3,82E-11	2,17E+06	6,97E-05	3,21E-11	67
17-13-G07	7,87E+05	1,37E-06	1,73E-12	7,80E+05	7,34E-05	9,41E-11	109
17-20-E06	1,19E+06	3,59E-06	3,03E-12	1,45E+06	3,27E-05	2,26E-11	101

Tabella 3: I seguenti dati di sequenza relativi alle CDR sono stati ottenuti per i suddetti cloni:

CDR	clone	Sequenza*	SEQ ID NO:
L1 CDR	16-22-H05	QASQSI F SGLA	7
	16-12-B11	QASQSI S NYLA	16
	16-13-C08	QASQSI STALA	17
	16-13-E05	QASQSI GRNLA	18
	16-16-B08	QASQSI SNSLA	19
	16-16-H10	QASQSI Y SGLA	20
	17-13-G07	QASQSI G SNLA	21
	17-20-E06	QASQSI S S S LA	22
		QASQSI X X X LA	1
	L2 CDR	16-22-H05	GASKLAS
16-12-B11		RASTLAS	23

CDR	clone	Sequenza*	SEQ ID NO:
	16-13-C08	RASTLES	24
	16-13-E05	QASKLAS	25
	16-16-B08	RASTLAS	23
	16-16-H10	GASKLAS	8
	17-13-G07	RASTLAS	23
	17-20-E06	RASKLAS	26
		XASXLXS	2
L3 CDR	16-22-H05	QSYYYSSSSSDGSYA	9
	16-12-B11	QSYYYSSSSSDGFFA	27
	16-13-C08	QSYYYSSSSSDGSFA	28
	16-13-E05	QSYYYSSSNSDGSIA	29
	16-16-B08	QSYYYSSISSDGSYA	30
	16-16-H10	QSYYYSSSSSDGSYA	9
	17-13-G07	QSYYYSSSSSDGSVA	31
	17-20-E06	QSYYYTSSTSDGSYA	32
		QSYYYXSSXSDGXXA	3
H1 CDR	16-22-H05	GIDFNNGYIG	10
	16-12-B11	GIDFSNYGIC	33
	16-13-C08	GIDFSNYGIS	34
	16-13-E05	GIDFSNYGIC	33
	16-16-B08	GIDFNNGYIG	10
	16-16-H10	GIDFNNGYIG	10
	17-13-G07	GIDFSTYGIS	35
	17-20-E06	GIDFSNYGIC	36
		GIDFXXYGIX	4
H2 CDR	16-22-H05	YIYPGFAITNFANSVKG	11
	16-12-B11	YIYPGFGITNYANSVKG	37
	16-13-C08	YIYPGFGIRNYAHSVKG	38
	16-13-E05	YIYPGFGIRNYANSLKG	39
	16-16-B08	YIYPGFAIRNYANSVKG	40
	16-16-H10	YIYPGFGITNFANSVKG	41
	17-13-G07	YIYPGFGITNYANSVKG	37
	17-20-E06	YIYPGFAIRNYANSVKG	40
		YIYPGFXIXNXAXSXKG	5
H3 CDR	16-22-H05	DPVYATSSGYFDL	12
	16-12-B11	DPIYASSSGYLDL	42
	16-13-C08	DPVYSSDWGYFNL	43
	16-13-E05	DPVYASSSGYLDL	44
	16-16-B08	DPLYATSSGYFDL	45
	16-16-H10	DPVYASSSGYFDL	46
	17-13-G07	DPVYASSSAYYNL	47
	17-20-E06	DPLYSTSSGYFNL	48
		DPXYXXXXXXYXXL	6

*Gli amminoacidi designati "X" hanno il significato definito nell'elenco della sequenza allegato.

1.2.2.7 Reattività incrociata a TNF α di scimmia
Cynomolgus (mediante SPR)

A causa dell'elevato numero di hit ad alta affinità che neutralizzavano in modo potente il TNF α , la reattività incrociata delle specie è stata valutata per tutti gli anticorpi monoclonali di coniglio sottoposti a RT-PCR al fine di facilitare la selezione dei cloni ASC per la conferma dell'Hit. Le affinità con TNF α di scimmia Cynomolgus sono state determinate mediante misurazioni SPR in modo simile a quanto descritto sopra (vedere anche 2.2.2). Le affinità degli anticorpi testati per 93 TNF α di scimmia Cynomolgus variavano da $9,6 \times 10^{-12}$ a $2,1 \times 10^{-9}$ M. 38 dei 93 anticorpi cross-reattivi si legavano a TNF α umano e Cynomolgus con affinità simile (differenza inferiore a due volte in K_D). Inoltre, la differenza di affinità tra umano e Cynomolgus era inferiore a 20 volte per 79 dei 93 anticorpi cross-reattivi e inferiore a 10 volte per 62 di essi, il che li rende accettabili per lo sviluppo preclinico nella scimmia Cynomolgus.

2. Metodi

2.1 Saggio di sorting

La procedura di sorting basata su citometria a flusso per l'isolamento di cellule B specifiche per antigene da un tessuto linfatico di coniglio è stata effettuata come delineato da Lalor et al (Eur J

Immunol.1992; 22.3001-2011)

2.2 Saggi di screening

2.2.1 ELISA di legame a TNF α (TNF α umano e di scimmia *Cynomolgus*)

TNF α umano ricombinante (Peprotech, Cat. No. 300-01) è stato applicato su una piastra ELISA per microtitolazione a 96 pozzetti. Il legame degli anticorpi di coniglio nei supernatanti della coltura ASC a TNF α immobilizzato è stato rilevato da un'IgG anti-coniglio secondaria marcata con HRP (Jackson Immuno Research, Cat. N. 111-035-046). Substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, KPL, Cat. No. 53-00-00) è stato aggiunto e la reazione cromatica è stata interrotta mediante l'aggiunta di H₂SO₄. Le piastre sono state lette usando un lettore per micropiastre (lettore Infinity M200 Pro, Tecan) a una lunghezza d'onda di 450 nm.

Le prestazioni del saggio durante le campagne di screening sono state monitorate da un anticorpo policlonale di coniglio anti-TNF α di controllo positivo disponibile in commercio (AbD Serotec, Cat. N. 9295-0174). A tale scopo l'anticorpo di controllo positivo è stato testato a 100 e 250 ng/ml in duplicato su ciascuna piastra di screening. Per ciascuna piastra è stata monitorata la robustezza e la

precisione della risposta del controllo positivo. Alle condizioni finali del saggio, il rapporto segnale-sfondo era compreso tra 30 e 40 per il controllo positivo a 250 ng/ml e il coefficiente di variazione (CV) del controllo positivo era inferiore al 10%. Un segnale con una densità ottica di $\geq 100\%$ rispetto al controllo positivo di 250 ng/ml è stato considerato come un hit di screening primario.

Per le determinazioni del titolo sierico, è stata usata la stessa configurazione ELISA descritta sopra. Una diluizione del siero è stata considerata positiva quando il segnale di legame del siero immunitario era almeno 3 volte più alto rispetto al segnale di un animale naïve non imparentato.

La reattività incrociata delle specie alla scimmia *Cynomolgus* è stata determinata usando un ELISA simile come descritto sopra. TNF α ricombinante di scimmia *Cynomolgus* (Sino Biological, Cat. N. 90018-CNAE) è stato applicato su piastre ELISA di microtitolazione a 96 pozzetti. Il legame degli anticorpi di coniglio nei supernatanti della coltura ASC a TNF α di scimmia *Cynomolgus* immobilizzata è stato rilevato dall'anticorpo secondario marcato con HRP come specificato sopra. Il siero immunitario del coniglio #2 è stato usato come controllo positivo a

una diluizione di 1:80'000 e 1:320'000. Per ciascuna piastra è stata monitorata la robustezza e la precisione della risposta del controllo positivo. Alle condizioni finali del saggio, il rapporto segnale-fondo era tra 20 e 30 per il controllo positivo a una diluizione di 1:80'000 e i CV del controllo positivo erano inferiori al 10%.

2.2.2 Cinetica di legame a TNF α mediante SPR (umano e scimmia *Cynomolgus*)

Le affinità di legame degli anticorpi verso TNF α umano sono state misurate mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR) usando uno strumento MASS-1 SPR (Sierra Sensors). Le prestazioni dello strumento sono state qualificate mediante soluzioni di riferimento standard nonché mediante analisi di un'interazione di riferimento anticorpo-antigene come l'interazione infliximab-TNF α .

Per lo screening di affinità, un anticorpo specifico per la regione Fc delle IgG di coniglio (Bethyl Laboratories, Cat. No. A120-111A) è stato immobilizzato su un chip sensore (sensore di affinità SPR-2, ammina ad alta capacità, sensori Sierra) usando una procedura standard di accoppiamento con ammina. Gli anticorpi monoclonali di coniglio nei supernatanti ASC sono stati catturati dall'anticorpo IgG anti-

coniglio immobilizzato. Dopo la cattura degli anticorpi monoclonali, TNF α umano (Peprotech, Cat. No. 300-01) è stato iniettato nelle celle a flusso per 3 min a una concentrazione di 90 nM, e la dissociazione della proteina dall'IgG catturata sul chip sensore è stata lasciata procedere per 5 min. Dopo ogni ciclo di iniezione, le superfici sono state rigenerate con due iniezioni di glicina-HCl 10 mM. Le costanti di tasso di dissociazione (k_d) e di associazione (k_a) apparente e la costante di dissociazione apparente all'equilibrio (K_D) sono state calcolate con il software di analisi MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) usando il modello di legame uno a uno Langmuir e la qualità degli adattamenti è stata monitorata in base al Chi² relativo (Chi² normalizzato al livello massimo di legame estrapolato dell'analita), il quale rappresenta una misura per la qualità dell'adattamento della curva. Per la maggior parte degli hit il valore relativo di Chi² era inferiore al 15%. I risultati sono stati considerati validi se le unità di risposta (RU) per il legame del ligando erano almeno il 2% delle RU per la cattura degli anticorpi. È stato ritenuto che i campioni con RU per il legame del ligando con meno del 2% delle RU per la cattura degli anticorpi non mostrassero alcun legame specifico di TNF α

all'anticorpo catturato.

La reattività incrociata tra specie di TNF α di scimmia *Cynomolgus* (Sino Biological, Cat. N. 90018-CNAE) è stata misurata usando la stessa configurazione del saggio e le stesse concentrazioni di TNF α e applicando le stesse misure di qualità. Il Chi² relativo era inferiore al 15% per la maggior parte dei supernatanti ASC analizzati.

2.2.3 Apoptosi indotta da TNF α in fibroblasti L929

La capacità delle IgG di coniglio provenienti dai supernatanti di colture ASC di neutralizzare l'attività biologica di TNF α umano ricombinante è stata valutata usando fibroblasti L929 di topo (ATCC/LGC Standards, Cat. N. CCL-1). Cellule L929 sono state sensibilizzate all'apoptosi indotta da TNF α mediante aggiunta di 1 μ g/ml di actinomicina D. Le cellule sono state coltivate in piastre per microtitolazione a fondo piatto da 96 pozzetti in presenza di supernatante di coltura ASC al 50% e 100 pM (5,2 ng/ml) umano TNF α (Peprotech, Cat. N. 300-01) per 24 ore. Rispetto agli anticorpi purificati, è necessario usare concentrazioni più elevate di TNF α in presenza di supernatanti ASC per lo screening di hit. La sopravvivenza delle cellule è stata determinata

mediante un saggio colorimetrico usando il reagente di proliferazione cellulare WST-8 (2-(2-metossi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disolfofenil)-2H-tetrazolio, sale monosodico) (Sigma Aldrich, Cat. 96992). WST-8 viene ridotto dalle deidrogenasi cellulari a un prodotto di formazano arancione. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule viventi. I dati sono stati analizzati usando un adattamento della curva logistica a quattro parametri usando il Softmax Data Analysis Software (Molecular Devices) e la concentrazione di infliximab necessaria per neutralizzare l'apoptosi indotta da TNF α del 50% (IC₅₀) è stata calcolata a una concentrazione di 36,2 ng/ml. Pertanto, il limite inferiore di rilevamento stimato per questo saggio è compreso tra 30 e 40 ng/ml. Questo valore è soltanto una stima approssimativa del limite di rilevamento, poiché il potenziale di blocco di TNF α non dipende soltanto dalla concentrazione dell'anticorpo monoclonale ma anche dall'affinità dell'anticorpo al bersaglio. Tuttavia, la sensibilità del saggio è sufficiente per lo screening dei supernatanti ASC poiché le concentrazioni di IgG nella maggior parte dei supernatanti ASC sono superiori a una concentrazione di 40 ng/ml. I supernatanti con

conseguente neutralizzazione del 50% dell'apoptosi indotta da TNF α sono stati considerati positivi.

Per assicurare prestazioni robuste del saggio durante le campagne di screening, l'anticorpo di controllo positivo infliximab è stato saggiato a 115 ng/ml (0,8 nM) ea 58 ng/ml (0,4 nM) in duplicato su ciascuna piastra di screening. L'inibizione percentuale e la precisione della risposta per il controllo positivo sono state monitorate per ciascuna piastra di screening. I criteri di accettazione per ciascuna piastra sono stati stabiliti come segue: inibizione di almeno il 60% con l'anticorpo di controllo positivo a una concentrazione di 115 ng/ml con un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 20%.

Esempio 2: Umanizzazione e generazione di scFv

1. Risultati

1.1 Conferma di hit e selezione di hit per l'umanizzazione

73 insiemi unici di domini variabili di catena pesante e leggera di coniglio parentali sono stati recuperati durante lo screening di hit e analizzati mediante allineamento di sequenza. Sulla base dei risultati del saggio di screening e dell'omologia di sequenza dei singoli cloni IgG di coniglio, sono stati

selezionati 30 candidati per la conferma di hit. Sono stati prodotti 29 anticorpi monoclonali e sono stati selezionati i cloni con le migliori prestazioni in termini di affinità e potenza per l'umanizzazione e la generazione del candidato guida. I criteri per la selezione dei cloni erano i) neutralizzazione di TNF α umano nel saggio L929, ii) alta affinità a TNF α umano, iii) reattività incrociata a TNF α di scimmia Cynomolgus e Rhesus e iv) diversità di sequenza. Un clone (16-22-H05) è stato selezionato per l'umanizzazione, una delle IgG con il miglior punteggio in termini di potenza per neutralizzare TNF α umano nel saggio L929. Per quanto riguarda la forza di legame, si desidera la migliore affinità possibile poiché è necessario prevedere una certa perdita di affinità come risultato dell'umanizzazione e della riformattazione nel formato scFv.

I dati per il clone IgG n. 16-22-H05 sono riassunti nella Tabella 4.

Tabella 4: Legame in vitro e proprietà di attività dell'anticorpo monoclonale purificato (16-22-H05)

Affinità a TNF umano			Affinità a TNF cyno			Affinità a TNF rhesus			Neutralizzazione di TNF nel saggio L929	Blocco dell'interazione TNF-TNFR1	Blocco dell'interazione TNF-TNFR2
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	rel. IC $_{50}$ *	rel. IC $_{50}$	rel. IC $_{50}$
4.04E+08	1.31E-04	3.25E-11	3.50E+08	4.89E-08	1.40E-12	2.01E+06	5.31E-04	2.65E-10	9,96	1,02	0,88

*: IC $_{50}$, Inhibition/IC $_{50}$, complete sperimentale

1.2 Generazione e selezione di frammenti scFv umanizzati

Le sequenze che codificano le regioni determinanti la complementarità (CDR) sono state trasferite in silico mediante innesto di loop CDR su una sequenza di scaffold a dominio variabile umana come descritto in WO 2014/206561. Inoltre, è stato generato un secondo costrutto per clone di coniglio, che ha trasferito amminoacidi aggiuntivi dalla sequenza del donatore in posizioni con rilevanza strutturale per i domini delle immunoglobuline e il posizionamento della CDR. È stato sintetizzato un gene artificiale (con un uso del codone ottimizzato per l'espressione batterica) che codifica il rispettivo anticorpo a catena singola umanizzato Fv (scFv) (dalle corrispondenti catene leggere e pesanti variabili). Il polipeptide è stato quindi prodotto e successivamente caratterizzato usando saggi simili come descritto durante la conferma dell'hit.

1.2.1 Umanizzazione e produzione di scFv umanizzati (API)

L'umanizzazione del clone selezionato comprendeva il trasferimento delle CDR di coniglio su una cornice di accettore scFv del tipo Vk1/VH3 come descritto in WO 2014/206561. In questo processo, che è

schematicamente mostrato nella Figura 1, la sequenza amminoacidica delle sei regioni CDR è stata identificata sulla sequenza del donatore (mAb di coniglio) e innestata nella sequenza dell'impalcatura accettrice, ottenendo i costrutti chiamati "innesto di CDR".

Inoltre, è stato designato un secondo innesto, che includeva modifiche amminoacidiche aggiuntive dal donatore di coniglio in corrispondenza delle posizioni L15, L22, L48, L57, L74, L87, L88, L90, L92, L95, L97, L99 e H24, H25, H56, H82, H84, H89, H108 (numerazione AHo), che sono state descritte come potenzialmente influenzanti il posizionamento della CDR e quindi il legame dell'antigene (Borras et al. JBC. 2010; 285:9054-9066). Questi costrutti umanizzati sono definiti "innesto strutturale (STR)". Nel caso in cui il confronto dei dati di caratterizzazione per questi due costrutti iniziali rivelasse un vantaggio significativo del costrutto STR, sono state designate varianti aggiuntive che combinavano la VL innestata con CDR con una VH innestata con STR. Questa combinazione ha dimostrato di essere spesso sufficiente per mantenere l'attività dell'innesto STR (Borras et al., 2010, JBC, 285:9054-9066) e potrà essere generalmente preferita poiché un minor numero

di alterazioni non umane nello scaffold di accettore umano riduce il rischio di stabilità ridotta e anche il potenziale di immunogenicità.

Una volta completata la progettazione del costrutto in silico descritto nella sezione precedente, i geni corrispondenti sono stati sintetizzati e sono stati costruiti i vettori di espressione batterica. La sequenza dei costrutti di espressione è stata confermata a livello del DNA e i costrutti sono stati fabbricati secondo protocolli di espressione e purificazione generici.

L'espressione eterologa delle proteine è stata effettuata in E.coli come corpi di inclusione insolubili. L'espressione di coltura è stata inoculata con una coltura iniziale in crescita esponenziale. La coltivazione è stata effettuata in beute agitate in un agitatore orbitale usando terreni ricchi disponibili in commercio. Le cellule sono state coltivate a una OD₆₀₀ definita di 2 e indotte mediante espressione durante la notte con isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 1 mM. Alla fine della fermentazione le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e omogeneizzate mediante sonicazione. A questo punto il livello di espressione dei differenti costrutti è stato determinato mediante

analisi SDS-PAGE del lisato cellulare. I corpi di inclusione sono stati isolati dal pellet cellulare omogeneizzato mediante un protocollo di centrifugazione che includeva svariate fasi di lavaggio per rimuovere i detriti cellulari e altre impurità delle cellule ospite. I corpi di inclusione purificati sono stati solubilizzati in un tampone denaturante (Tris/HCl 100 mM a pH 8,0, Gdn-HCl 6 M, EDTA 2 mM) e gli scFv sono stati rinaturati mediante un protocollo di rinaturazione scalabile che generava quantità di milligrammi di scFv monomero ripiegato in modo nativo. Un protocollo standardizzato è stato impiegato per purificare gli scFv, che includeva le seguenti fasi. Il prodotto dopo la rinaturazione è stato catturato da una cromatografia di affinità usando l'agarosio Capto L (GE Healthcare) per ottenere scFv purificati. I candidati principali che soddisfacevano i criteri di affinità e potenza nei test iniziali sono stati ulteriormente purificati da una cromatografia di esclusione dimensionale lucidante usando una colonna HiLoad Superdex75 (GE Healthcare). Successivamente al protocollo di purificazione le proteine sono state formulate in una soluzione salina tamponata e caratterizzate dai vari metodi biofisici, di interazione proteica e biologici, come descritto di

seguito. La producibilità dei differenti costrutti è stata confrontata determinando la resa finale di proteina purificata per il lotto e normalizzando questo valore a 1 l di volume di rinaturazione.

1.2.2 Caratterizzazione biofisica di un scFv umanizzato

La caratterizzazione biofisica di scFv rispetto alla stabilità e alla producibilità è stata compilata nella Tabella 5. La producibilità e la stabilità del costrutto scFv è stata caratterizzata dai differenti punti di rendicontazione discussi nelle sezioni successive.

L'scFv è stato esaminato in base a determinati criteri, come spiegato di seguito.

Il criterio di *producibilità* deve garantire che l'entità scFv selezionata possa essere espressa, rinaturata e purificata in quantità sufficienti per supportare lo sviluppo successivo della molecola di piombo. I criteri definiti erano la resa di espressione di scFv per litro di brodo di fermentazione, valutata mediante SDS-PAGE, e la resa di purificazione ottenuta nel processo generico su scala di laboratorio, valutata mediante misurazione della quantità di proteina purificata mediante spettrometria UV, calcolata a 1 litro di soluzione

rinaturabile.

I criteri di *stabilità* avevano lo scopo di valutare la propensione all'aggregazione durante il processo di fabbricazione delle molecole e la loro integrità strutturale durante lo stoccaggio e l'ulteriore manipolazione. Il contenuto di monomero determinato mediante SE-HPLC consente di valutare la stabilità colloidale delle molecole durante il processo di purificazione (2.2.3). In un successivo studio di stabilità il contenuto di monomero è stato testato per una durata di 4 settimane a 1 e 10 mg/ml e <-65° C. Inoltre, la stabilità colloidale delle proteine è stata testata dopo 5 cicli di congelamento e scongelamento. Come parametro aggiuntivo che indica la stabilità, il punto medio della denaturazione termica è stato determinato mediante fluorimetria a scansione differenziale (DSF) (2.2.4) per fornire una lettura per la stabilità conformazionale dei candidati principali.

Tabella 5: Riepilogo dei dati di caratterizzazione biofisica per gli scFv umanizzati.

ID clone	Costrutto	Stabilità					Producibilità		
		T _m (°C)	Conservazione			Congelamento/ scongelo (Δ %)	Purezza (%)	Espressione (g/L)	Resa di purificazione (mg/L)
			-65°C	-25°C	4°C				
16-22-H05-sc01	CDR	74.2	nd	nd	nd	nd	98.0	nd	19.1
16-22-H05-sc02	16-22-H05 STR	71.3	0.0	0.0	0.0	0.0	99.9	0.27	85.9
16-22-H05-sc04	CDR/STR	72.6	0.2	0.1	0.4	0.0	100.0	0.25	24.1

1.2.2.1 Valutazione della producibilità

Le molecole scFv candidate guida sono state espresse mediante fermentazione in pallone agitato in modalità batch e purificate mediante un processo generico su scala di laboratorio per produrre i campioni di proteine per un'ulteriore caratterizzazione. Durante questo processo sono stati monitorati alcuni parametri chiave delle prestazioni per confrontare le molecole candidate e identificare costrutti potenzialmente difficili da sviluppare. Il titolo di espressione è stato determinato a livello del lisato grezzo di *E. coli* dopo la raccolta delle cellule mediante centrifugazione. Durante la raccolta è prevista una piccola perdita di cellule, tuttavia è stato deciso di trascurare questo fattore per il calcolo della resa di espressione a favore di una stima più conservativa della produttività. Per la quantificazione del prodotto scFv nel lisato colorato con Coomassie di SDS-PAGE riducente (2.2.1) è stato selezionato grazie all'elevata specificità del metodo che permette di discriminare il prodotto dalle proteine della cellula ospite nel campione.

Un secondo criterio per valutare la producibilità è la resa di purificazione di scFv calcolata per litro di soluzione di rinaturazione. Questo parametro

affronta il potenziale collo di bottiglia nel processo di produzione previsto che include una fase di rinaturazione delle proteine. Poiché l'efficienza della procedura di rinaturazione si è dimostrata limitante in processi di produzione comparabili, si è deciso di confrontare le prestazioni dei differenti costrutti rispetto alla producibilità normalizzata a un volume di rinaturazione definito. Per il calcolo della resa, il campione proteico finale di ciascun lotto è stato quantificato mediante assorbanza UV (2.2.2) e diviso per il volume di rinaturazione effettivo della rispettiva purificazione (Tabella 6).

Tabella 6: Riepilogo dei dati di producibilità per due scFv umanizzati. Il titolo di espressione è stato determinato mediante SDS-PAGE quantitativa su lisati di cellule di fine produzione. La resa del lotto è stata determinata mediante misurazione dell'assorbanza UV del pool di purificazione finale. La resa di purificazione è calcolata come scFv purificato per litro di volume di rinaturazione.

ID costruito	Titolo di espressione [g/l]	Resa lotto [mg]	Producibilità	
			Volume di rinaturazione [L]	Resa di purificazione [mg/l]
16-22-H05-sc02	0,27	14,3	0,48	29,8
16-22-H05-sc04	0,26	11,9	0,49	24,1

1.2.2.2 Valutazione della stabilità

La valutazione della stabilità conformazionale,

monodispersità e integrità strutturale dei costrutti scFv è una componente integrante per la classificazione delle differenti molecole rispetto alla sviluppabilità. Un prerequisito per il confronto significativo dei differenti costrutti è la preparazione di molecole purificate di qualità simile. Il criterio "purezza monomerica" determinato mediante SE-HPLC punta a garantire la qualità compatibile delle differenti sostanze in esame. Oltre all'analisi SE-HPLC, è stato effettuato un SDS-PAGE per la determinazione della purezza e dell'identità delle proteine per confermare la qualità comparabile delle preparazioni testate.

I risultati SE-HPLC dei due scFv rivelano che tutte le preparazioni potrebbero essere purificate a un contenuto di monomero $\geq 99\%$ (Figura 2).

Il comportamento di denaturazione termica dei candidati principali è stato testato mediante fluorimetria a scansione differenziale (DSF) per consentire la classificazione delle molecole rispetto alla loro stabilità conformazionale attesa. Un grafico normalizzato dei dati grezzi di fluorescenza è raffigurato nella Figura 3, che descrive le misurazioni duplicate di ogni campione. È stato osservato un comportamento di denaturazione

cooperativo. Le due molecole 16-22-H05-sc02 e 16-22-H05-sc04 mostravano una T_m rispettivamente di 71,3 e 72,6° C.

In un secondo braccio della valutazione della stabilità è stata monitorata la monodispersità delle molecole per la durata di 4 settimane a differenti temperature. I risultati dello studio di stabilità e il contenuto di monomero risultante sono mostrati nella Figura 4. Entrambe le molecole (16-22-H05-sc02 e 16-22-H05-sc04) iniziano con un contenuto di monomero superiore al minimo del 95% di monomero e perdono meno del 5% di monomero rispetto al rispettivo valore di partenza a una concentrazione di 10 mg/ml. Allo stato congelato a -20° C e < -65° C i campioni mostravano soltanto minime differenze nel tempo. Alla condizione più stringente (4° C) la molecola 16-22-H05-sc02 ha perso solo lo 0,2% di monomero durante le 4 settimane. Inoltre, è stato condotto uno studio di stabilità alla sollecitazione a una temperatura di 37° C e una concentrazione di scFv di 10 mg/ml per un massimo di 4 settimane. A questa condizione ci si aspetta una discriminazione più stringente della propensione all'aggregazione dei differenti costrutti. I dati risultanti riassunti nella Figura 6 hanno rivelato una perdita di monomero del 15% dopo 28 giorni. Entrambi

gli scFv hanno dimostrato una buona stabilità del monomero in condizioni di sollecitazione. I cromatogrammi dello studio di stabilità a 4° C sono forniti nella Figura 5, dove viene mostrato il campione al giorno 0 e dopo 28 giorni a 4° C. In questo cromatogramma vengono mostrati anche i risultati della stabilità di congelamento/scongelo. Per questa parte dello studio i campioni sono stati ripetutamente congelati e scongelati per un totale di 5 cicli. La risultante quantificazione del contenuto di monomero mediante SE-HPLC analitica non ha rivelato alcun cambiamento nei due campioni (Tabella 5).

È stata effettuata un'analisi SDS-PAGE per i due scFv per generare dati di supporto per la quantificazione mediante assorbanza UV, confermando la purezza della preparazione del campione e conferendo quindi specificità per la quantificazione del contenuto. In un altro aspetto di questa analisi i risultati della SDS-PAGE hanno rivelato l'assenza di degradazione delle proteine durante lo studio di stabilità (28 giorni a 4° C e una concentrazione di 10 mg/ml rispetto al campione dal giorno 0 conservato a < -65° C), caratteristica importante dal punto di vista dello sviluppo.

È importante notare che i differenti studi effettuati nell'ambito di questa valutazione affrontano aspetti meccanicistici distinti della stabilità delle proteine. La determinazione della temperatura di denaturazione termica di una proteina darà risultati complementari alla misura della monodispersità mediante SE-HPLC dopo la conservazione a temperatura elevata. Sebbene entrambi i metodi siano designati per fornire una stima del potenziale di conservazione e stabilità del prodotto, i meccanismi affrontati sono profondamente differenti. Il punto medio di transizione (T_m) valutato dalla denaturazione termica è una misura qualitativa per la stabilità del dominio proteico (non consente la determinazione termodinamica di ΔG). I domini proteici altamente stabili (alta T_m) hanno meno probabilità di svilupparsi spontaneamente a temperatura ambiente e quindi sono meno inclini all'aggregazione/precipitazione irreversibile guidata dalle interazioni del dominio denaturato. L'elevata stabilità del dominio indica un confezionamento denso di residui amminoacidici, che è anche correlato alla resistenza al clivaggio della proteasi. La valutazione SE-HPLC determina invece quantitativamente il contenuto della frazione monomerica nonché di

oligomeri/aggregati solubili. Tali oligomeri solubili sono spesso associazioni reversibili e relativamente sciolte guidate da interazioni elettrostatiche o idrofobiche tra proteine correttamente piegate. Esiste una certa correlazione tra la T_m valutata dalla denaturazione termica e la propensione alla formazione di oligomeri/aggregati valutata mediante SE-HPLC, in particolare per le proteine con stabilità "borderline". Oltre una certa soglia di T_m di circa 60° C i domini variabili dell'anticorpo sono generalmente sufficientemente stabili per essere resistenti all'aggregazione/precipitazione e alla degradazione proteolitica a causa della parziale denaturazione del dominio a temperatura ambiente. Tuttavia, può ancora verificarsi l'oligomerizzazione guidata da interazioni idrofobiche e/o elettrostatiche dei residui superficiali. È importante sottolineare che in uno studio di stabilità accelerata (sollecitazione) a temperatura elevata (per esempio 37° C) i vari meccanismi di formazione e precipitazione degli oligomeri possono verificarsi simultaneamente.

1.2.3 Caratterizzazione di legame e attività di scFv umanizzati *in vitro*

Di seguito gli scFv umanizzati sono stati caratterizzati *in vitro* per le loro proprietà e

potenze di legame al bersaglio. È stata analizzata la cinetica di legame (k_a , k_d e K_D) a TNF α umano e la potenza per neutralizzare l'apoptosi dei fibroblasti L929 indotta da TNF α . Inoltre, è stata determinata la potenza per inibire l'apoptosi indotta da TNF α di scimmia *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) e di scimmia Rhesus (*Macaca mulatta*), nonché la potenza per inibire l'interazione tra TNF α umano e TNFR1/TNFR2 mediante ELISA e la selettività di bersaglio per il legame a TNF α rispetto a TNF β .

Per la comprensione dei risultati seguenti è importante notare che sia il trasferimento delle CDR di coniglio su uno scaffold di dominio variabile umano sia il cambiamento nel formato dall'IgG a grandezza naturale al frammento scFv possono avere un impatto sulle proprietà farmacologiche. Per esempio, una certa perdita di affinità è solitamente associata all'umanizzazione. Inoltre, a causa delle dimensioni inferiori dello scFv rispetto all'IgG, la capacità di uno scFv di interferire con i partner di interazione attraverso un ostacolo sterico è ampiamente ridotta. Infine, ma non meno importante, occorre notare che a causa della sua modalità bivalente di legame a TNF α omo trimerico, l'affinità dell'IgG genitore potrebbe essere stata segnalata troppo alta (artefatto SPR). Di

conseguenza, quando vengono confrontate le affinità tra IgG di coniglio bivalente parentale e scFv monovalente umanizzato, la "perdita di affinità" riportata può essere sovrastimata.

1.2.3.1 Affinità

L'affinità degli scFv umanizzati con TNF α umano è stata determinata mediante misurazioni SPR (vedere anche 2.1.1). L'affinità è stata determinata usando diluizioni seriali 2 volte dei rispettivi scFv. Gli scFv sono stati derivati da un anticorpo monoclonale di coniglio. Sono state generate due varianti scFv, denominate "CDR" (CDR) e "innesto strutturale" (STR). Per valutare il contributo relativo delle sostituzioni di cornice nella catena leggera e in quella pesante e per ridurre possibilmente il numero di residui amminoacidici di coniglio introdotti nella cornice umana, sono stati effettuati esperimenti di shuffling di dominio. Pertanto, i costrutti scFv contenenti una catena leggera innestata con CDR e una catena pesante a innesto strutturale (CDR/STR) sono stati generati per il clone 16-22-H05.

I primi scFv 16-22-H05-sc02 (STR) e 16-22-H05-sc04 (CDR/STR) si legano con affinità rispettivamente di $4,5 \times 10^{-11}$ e $1,1 \times 10^{-10}$ M. 16-22-H05-sc04 mostrava soltanto una leggera riduzione di affinità rispetto

alla sua variante di "innesto strutturale" (16-22-H04-sc02) (vedere tabella 7). Questi risultati suggeriscono che l'affinità degli scFv umanizzati dipende principalmente dai pochi amminoacidi di coniglio introdotti nella struttura della catena pesante umana.

1.2.3.2 Potenza

La capacità degli scFv umanizzati di neutralizzare TNF α umano è stata analizzata usando il saggio L929 (vedere anche 2.1.2). La potenza (IC₅₀ e IC₉₀) per neutralizzare l'apoptosi indotta da TNF α è stata analizzata per scFv derivati da 16-22-H5 e confrontata con la potenza dell'anticorpo di riferimento infliximab per consentire il confronto diretto dei valori di IC₅₀ e IC₉₀ da differenti piastre di saggio. I valori relativi di IC₅₀ e IC₉₀ sono stati calcolati in unità di massa (ng/ml) di infliximab e scFv. L'analisi della potenza è stata effettuata più volte in giorni svariati con lotti svariati di frammenti di anticorpi. La Figura 7 mostra curve dose-risposta rappresentative di un esperimento per ciascuno dei due scFv. I valori medi delle misurazioni replicate sono mostrati nella Tabella 7 (le deviazioni standard sono riassunte nella legenda della tabella).

Gli scFv umanizzati inibivano l'apoptosi indotta

da TNF α con valori di IC₅₀ e IC₉₀ inferiori rispetto a infliximab (vedere la Tabella 7). Coerentemente con i risultati SPR, la variante 16-22-H05-sc04 (CDR/STR) con shuffling di dominio mostrava la stessa potenza rispetto all'innesto strutturale 16-22-H05-sc02 (STR). Gli scFv 16-22-H05-sc04 e 16-22-H05-sc02 mostravano eccellenti attività di neutralizzazione di TNF α , con valori di IC₅₀ rispettivamente di 14,6 e 13,1 volte migliori rispetto a infliximab. I valori IC₉₀ di 16-22-H05-sc04 e 16-22-H05-sc02 erano rispettivamente di 13,1 e 12,6 volte migliori rispetto a infliximab. Come osservato per gli anticorpi monoclonali di coniglio parentale, non c'era una chiara correlazione tra affinità e potenza degli anticorpi (correlazione non mostrata). Tuttavia, scFv derivato da 16-22-H05 che mostra le affinità più elevate (16-22-H05-sc02 (STR) e 16-22-H05-sc04 (CDR/STR)) mostrava anche la massima potenza. Inoltre, i risultati dei saggi di neutralizzazione suggeriscono che è necessario raggiungere una certa affinità di soglia per un'efficace inibizione della segnalazione di TNF α . Per esempio, scFv 16-14-D08-sc01 (CDR), 16-15-C09-sc01 (CDR), 16-24-H07-sc01 (CDR) e 17-20-G01-sc01 (CDR), tutti che legano TNF α con affinità superiori a 1 nM, mostrano uno scarso potenziale per neutralizzare TNF α



(non mostrato).

1.2.3.3 Reattività incrociata tra specie (TNF α di scimmia Cynomolgus e Rhesus)

La reattività incrociata delle specie per gli scFv di primo livello è stata determinata con due metodi: 1) potenza per neutralizzare TNF α di scimmia Cynomolgus e scimmia Rhesus nel saggio L929 e 2) affinità a TNF α di scimmia Cynomolgus e scimmia Rhesus mediante SPR. La potenza per neutralizzare TNF α dalle differenti specie è stata determinata mediante il saggio L929 in modo simile a quanto descritto sopra per TNF α umano usando rispettivamente TNF α di scimmia Cynomolgus e di scimmia Rhesus (vedere anche 2.1.2). TNF α di entrambe le specie mostrava una potenza molto simile nell'indurre l'apoptosi L929 (dati non mostrati). Pertanto, le stesse concentrazioni di TNF α nell'uomo e nella scimmia sono state usate per i test di reattività incrociata delle specie. Inoltre, la cinetica di legame (mediante SPR) a TNF α di scimmia Cynomolgus e di scimmia Rhesus è stata determinata usando un saggio simile a quello di TNF α umano (vedere anche 2.1.1).

Tutti gli scFv derivati dal clone 16-22-H05 mostravano reattività incrociata a TNF α di scimmia Cynomolgus e scimmia Rhesus (vedere Tabella 7). Le

affinità erano simili, vale a dire $2,0 \times 10^{-10}$ e $2,3 \times 10^{-10}$ M rispettivamente per Scimmia Cynomolgus e scimmia Rhesus. La differenza di affinità tra TNF α umano e di scimmia era di circa 5 volte. Le potenzialità per neutralizzare TNF α di scimmie Cynomolgus, Rhesus e umano erano ben correlate con le affinità con i rispettivi TNF α . Di conseguenza, i due cloni derivati da 16-22-H05 mostravano potenze da 5 a 7 volte inferiori verso TNF α di scimmia rispetto a TNF α umano (vedere Tabella 7 e Figura 8). Per riassumere, i due scFv mostravano reattività incrociata a TNF α delle specie Cynomolgus e Rhesus.

1.2.3.4 Blocco dell'interazione TNF α -TNFRI/II umana

Oltre al saggio L929, l'ELISA ha valutato la potenza di ciascun scFv umanizzato nell'inibire l'interazione tra TNF α umano e TNFRI/II (vedere 2.1.3). Analogamente al saggio L929, i valori di IC₅₀ individuali su ciascuna piastra sono stati calibrati rispetto all'IC₅₀ della molecola di riferimento infliximab che è stata portata su ciascuna piastra e i relativi valori di IC₅₀ e IC₉₀ sono stati calcolati in unità di massa (ng/ml) di Infliximab e scFv.

I saggi di neutralizzazione possono distinguere le potenze degli anticorpi bloccanti il bersaglio

soltanto se legano il loro bersaglio con una costante di legame all'equilibrio (KD) che è maggiore della concentrazione di bersaglio usata nel saggio di potenza ($KD > \text{concentrazione di bersaglio}$). Per il saggio L929 è stata usata una concentrazione di $TNF\alpha$ di 5 pM mentre negli ELISA di inibizione di $TNFR1/II$ è stata usata una concentrazione di $TNF\alpha$ di 960 pM. Pertanto, in teoria, il saggio L929 può differenziare le potenze tra scFv con $KD > 5 \text{ pM}$, mentre l'inibizione ELISA può soltanto differenziare le potenze tra scFv con $KD > 960 \text{ pM}$. Poiché tutti gli scFv analizzati mostravano KD inferiori a 960 pM, le potenze tra scFv con affinità differenti (ma meccanismo d'azione simile) possono essere differenziate soltanto nel saggio L929.

16-22-H5-sc02 e 16-22-05-sc04 mostravano potenze per il blocco dell'interazione $TNF\alpha$ - $TNFR1$ tra 2,8 e 3,5 volte superiori rispetto a infliximab mentre la potenza rispetto a infliximab nel saggio L929 era significativamente più alta (13,1 e 14,6 volte). Quando vengono confrontati i valori relativi di IC_{50} per le IgG parentali di coniglio (vedere Tabella 2) con i valori relativi di IC_{50} per gli scFv umanizzati (Tabella 7), le potenze degli scFv sono in generale leggermente superiori rispetto alle IgG parentali sebbene le affinità in generale siano nello stesso

intervallo per le IgG di coniglio parentale. Poiché le potenze degli anticorpi e degli scFv sono state confrontate in unità di massa, il numero di valenze (siti di legame di TNF α) a ciascuna concentrazione è circa 2,9 volte più alto per gli scFv monovalenti rispetto alle IgG più di cinque volte più pesanti ma bivalenti. Con scFv di legame ad affinità molto elevata, ciò ha come risultato un blocco più potente dell'interazione TNF α e TNFRI/II poiché la mancanza di avidità non è più critica per l'attività. Al contrario, con i domini monovalenti a bassa affinità è stato pubblicato l'opposto (Coppieters et al. Artrite e reumatismi, 2006; 54:1856p-1866). Per i motivi summenzionati, i risultati dell'inibizione ELISA non sono stati usati per la classificazione delle potenze tra i differenti anticorpi ma principalmente per il confronto del potenziale degli anticorpi di bloccare l'interazione con TNFRI rispetto a TNFRII. Gli scFv studiati hanno bloccato l'interazione tra entrambi i recettori TNF α con potenze comparabili (Tabella 9, Figura 9 e Figura 10).

1.2.3.5 Specificità di bersaglio (selettività per il legame a TNF α rispetto a TNF β)

La specificità dei due scFv (16-22-H05-sc02 e 16-22-H05-sc04) per TNF α rispetto a TNF β è stata

confermata dalla valutazione del potenziale relativo di TNF β rispetto a TNF α per inibire per metà il legame di TNF α a ciascun scFv ed è stato misurato in un ELISA competitivo (vedere anche 2.1.4). La qualità di TNF β umano ricombinante è stata analizzata 1) per la purezza mediante saggio SDS-page e HPLC, e 2) per l'attività biologica nel saggio di citotossicità L929 nel topo, dal produttore della proteina. Come mostrato nella Figura 11, l'interazione tra ciascuno degli scFv con TNF α biotinilato è stata bloccata da TNF α senza etichetta con valori di IC₅₀ compresi tra 60 e 260 ng/ml, mentre TNF β non mostrava alcun effetto significativo anche alla massima concentrazione di TNF β testata (1250 μ g/ml). Pertanto, tutti gli scFv analizzati si legano specificamente a TNF α ma non al suo omologo più vicino, TNF β . TNF β non mostrava alcuna inibizione significativa del legame di TNF α agli scFv alle concentrazioni testate. Pertanto, la concentrazione di TNF β richiesta per inibire fino a metà il legame di TNF α deve essere significativamente più alta della concentrazione più alta di TNF β usata nel saggio (1250 μ g/ml). Quando vengono confrontate le concentrazioni di TNF α e TNF β richieste per inibire fino alla metà del massimo il legame di TNF α agli scFv, la selettività per il legame a TNF α rispetto a TNF β è

significativamente maggiore di circa 5000-20.000 volte per tutti i frammenti testati (vedere anche Tabella 7). Pertanto, il legame fuori bersaglio di uno qualsiasi degli scFv sembra altamente improbabile.

I risultati degli esperimenti descritti sopra sono riassunti nelle tabelle da 7 a 9.

Tabella 7. Legame in vitro e proprietà di attività degli scFv umanizzati. CDR: "Innesto di CDR", STR: "innesto strutturale". L'analisi della potenza è stata effettuata più volte in giorni svariati con lotti svariati di frammenti di anticorpi con le seguenti deviazioni standard: 16-22-H05-sc02 (n = 3): IC₅₀ rel. = 13,1 ± 1,8 e IC₉₀ rel. = 12,6 ± 3,5; 16-22-H05-sc04 (n=2): IC₅₀ rel. = 14,6 ± 0,6 e IC₉₀ rel. = 13,1 ± 2,4.

scFv	Progettazione	Affinità a TNFα umano			Affinità a TNFα cyno			Affinità a TNFα Rhesus			Potenza	specificità per specie, IC ₅₀ [ng/ml]			Selettività di bersaglio, IC ₉₀ o rel. di TNFβ vs TNFα	
		k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)		rel. IC ₅₀ ^a	rel. IC ₉₀ ^a	umano		cino
16-22-H05-sc02	STR	9.6E+05	4.3E-05	4.5E-11	4.9E+05	9.8E-05	2.0E-10	6.7E+05	1.5E-04	2.3E-10	13,1	12,6	0,6	2,9	3,0	>> 10'000
16-22-H05-sc04	CDR/STR	6.8E+05	7.1E-05	1.1E-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14,6	13,1	0,5	3,5	2,9	>> 10'000

^a: IC₅₀, Inibizione (ng/ml)/IC₅₀, scFv (ng/ml)
^b: IC₉₀, Inibizione (ng/ml)/IC₉₀, scFv (ng/ml)

Tabella 8. Specifiche di scFv umanizzati della presente invenzione.

Espressione	Producibilità		Stabilità		Perdita di monomero dopo 5 cicli di congelamento/scongelo
	Resa d'espressione [g/l]	Resa di rinaturazione [mg/l]	Denaturazione termica [°C]	Perdita di monomero dopo 4 s a 10 g/l a 4° C (-65, -20) [Δ%]	
16-22-H05-sc02	0,26	29,8	71,3	0,2 (0,0, 0,0)	0,0
16-22-H05-sc04	0,26	24,1	72,6	0,4 (0,2, 0,1)	0

Tabella 9. Potenza degli scFv nel bloccare l'interazione TNF α -TNFR1 e TNF α -TNFR2.

scFv	Blocco dell'interazione TNF α -TNFR1			Blocco dell'interazione TNF α -TNFR2		
	rel. IC ₅₀ *	IC ₅₀ [ng/mL]	IC ₉₀ [ng/mL]	rel. IC ₅₀ *	IC ₅₀ [ng/mL]	IC ₉₀ [ng/mL]
16-22-H05-sc02	3,5	2,4	13,9	5,7	39,8	20,0
16-22-H05-sc04	2,8	2,1	17,7	3,5	45,3	32,6

*: IC₅₀, infliximab (ng/ml)/IC₅₀, scFv (ng/ml)

#: IC₉₀, infliximab (ng/ml)/IC₉₀, scFv (ng/ml)

2. Metodi

2.1 Saggi di caratterizzazione della guida

2.1.1 Cinetica di legame e reattività incrociata tra specie mediante SPR

Le affinità di legame degli scFv verso TNF α umano sono state misurate mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR) usando uno strumento MASS-1 SPR (Sierra Sensors). Le prestazioni del saggio SPR sono state qualificate mediante analisi di un'interazione antigenica anticorpale di riferimento come l'interazione certolizumab-TNF α . Il frammento Fab pegilato certolizumab è stato selezionato come riferimento per la sua modalità di legame monovalente simile a quella degli scFv. Usando la stessa configurazione del saggio delle misurazioni di affinità degli scFv, è stato determinato un valore di $9,94 \times 10^{-11}$ M per l'affinità di certolizumab con TNF α . Questo valore è in buon accordo con i valori K_D pubblicati di $9,02 \pm 1,43 \times 10^{-11}$ M (BLA certolizumab; Numero BLA: 125160; data di presentazione: 30 aprile 2007).

Per le misurazioni di affinità di scFv TNF α umano (Peprotech, Cat. N. 300-01) è stato immobilizzato su un chip sensore (SPR-2 Affinity Sensor, Amine, Sierra Sensors) mediante accoppiamento con ammina per

raggiungere un livello di immobilizzazione da 50 a 100 RU (i livelli di immobilizzazione ottenuti durante l'analisi SPR erano compresi tra 40 e 120 RU). In una prima fase, lo screening di affinità degli scFv è stato effettuato usando una sola concentrazione di scFv (90 nM). In una seconda fase, per gli scFv con le migliori prestazioni, è stata misurata la cinetica del ciclo a iniezione singola (SiCK, Single Injection Cycle Kinetics) da un singolo ciclo di iniezione iniettando simultaneamente sei campioni di analita a differenti concentrazioni in ciascuno degli otto canali paralleli nel sistema MASS-1. Per gli screening di affinità, scFv umanizzati sono stati iniettati nelle celle a flusso a una concentrazione di 90 nM per tre minuti e la dissociazione è stata monitorata per 12 minuti. Per le successive determinazioni di affinità più precise, diluizioni seriali duplici di scFv comprese tra 45 e 1,4 nM sono state iniettate nelle celle a flusso per tre minuti e la dissociazione della proteina da TNF α immobilizzato sul chip sensore è stata lasciata procedere per 12 minuti. Le costanti di velocità di dissociazione apparente (k_d) e di associazione (k_a) e la costante di dissociazione all'equilibrio apparente (K_D) sono state calcolate con il software di analisi MASS-1 (Analyzer, Sierra



Sensors) usando il modello di legame uno a uno Langmuir e la qualità degli accoppiamenti è stata monitorata in base al χ^2 , che è una misura per la qualità dell'adattamento della curva. Più piccolo è il valore per il χ^2 , più accurato è l'adattamento al modello di legame di Langmuir uno a uno. Per gli screening di affinità, i risultati sono stati ritenuti validi se il χ^2 era inferiore a 10 per la concentrazione analizzata. Nei casi in cui sono state analizzate svariate concentrazioni di scFv, i risultati sono stati ritenuti validi se il χ^2 medio su tutte le concentrazioni testate era inferiore a 10. I criteri di accettazione sono stati soddisfatti per tutti gli scFv testati.

La reattività incrociata tra specie a TNF α di scimmia Cynomolgus (Sino Biological, Cat. 90018-CNAE) e di scimmia Rhesus (sistemi di ricerca e sviluppo, cat. 1070-RM-025/CF) (Peprotech, Cat. N. 315-01A) è stata misurata usando la stessa configurazione del saggio e applicando le stesse misure di qualità descritte sopra per TNF α umano. Per scimmia Cynomolgus e Rhesus sono stati raggiunti livelli di immobilizzazione di TNF α compresi tra 50 e 180 RU e da 90 a 250 RU, rispettivamente. Gli scFv sono stati analizzati usando diluizioni seriali duplici con

concentrazioni che variano tra 45 e 1,4 nM. I valori medi di χ^2 erano inferiori a 10 per tutti gli scFv testati.

2.1.2 Apoptosi indotta da TNF α nei fibroblasti L929 (neutralizzazione di primati umani, non umani e TNF α da parte di scFv)

La capacità degli scFv di neutralizzare l'attività biologica di TNF α umano ricombinante è stata valutata usando fibroblasti L929 di topo (ATCC/LGC Standards, Cat. N. CCL-1). Le cellule L929 sono state sensibilizzate all'apoptosi indotta da TNF α mediante aggiunta di 1 μ g/ml di actinomicina D. Diluizioni seriali in triplicato di anticorpo di riferimento anti-TNF α o scFv (3000-0,05 ng/ml) e TNF α umano ricombinante 5 pM (Peprotech, Cat. No. 300-01) sono state preincubate a temperatura ambiente per 1 ora. La concentrazione di TNF α usata (5 pM) induce l'apoptosi L929 submassimale (EC_{90}). Dopo l'aggiunta delle miscele agonista/inibitore, le cellule sono state incubate per 24 ore. La sopravvivenza delle cellule è stata determinata mediante un saggio colorimetrico usando il reagente di proliferazione cellulare WST-8 (2-(2-metossi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disolfofenil)-2H-tetrazolio, sale monosodico) (Sigma Aldrich, Cat. N. 96992). WST-8

viene ridotto dalle deidrogenasi cellulari a un prodotto di formazano arancione. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule viventi. I dati sono stati analizzati usando un adattamento della curva logistica a quattro parametri usando il Softmax Data Analysis Software (Molecular Devices) e la concentrazione di anticorpi di riferimento o scFv necessari per neutralizzare l'apoptosi indotta da TNF α del 50% e del 90% (IC₅₀ e IC₉₀) è stata calcolata (vedere anche la Figura 7). Per rendere i valori di IC₅₀ e IC₉₀ direttamente confrontabili tra esperimenti effettuati in giorni differenti o su piastre di saggio differenti, i valori di IC₅₀ e IC₉₀ sono stati calibrati contro l'anticorpo di riferimento infliximab. Per controllare la precisione della risposta, le curve dose-risposta sono state analizzate in duplicato. Le deviazioni standard e le CV sono state calcolate per ciascun punto di misurazione (CV < 20%).

La reattività incrociata tra specie a TNF α di scimmia Cynomolgus (Sino Biological, Cat. 90018-CNAE) e di scimmia Rhesus (sistemi di ricerca e sviluppo, cat. N. 1070-RM-025/CF) è stata misurata usando la stessa configurazione del saggio e applicando le stesse misure di qualità descritte sopra per TNF α



umano. Analogamente alla controparte umana, le concentrazioni di TNF α che inducono l'apoptosi di L929 submassimale (EC₉₀) sono state usate per i test di reattività incrociata tra specie. TNF α di entrambe le specie mostrava una potenza molto simile a TNF α umano nell'indurre l'apoptosi dei fibroblasti di topo L929. Di conseguenza la stessa concentrazione di TNF α (5 pM) è stata usata per altre specie testate. Durante i test di reattività incrociata delle specie, i CV della maggior parte dei punti di misurazione duplicati erano inferiori al 10%.

2.1.3 ELISA di inibizione di TNF α

L'effetto inibitorio degli scFv sul legame del ligando è stato valutato usando un ELISA, un metodo biochimico che riproduce esclusivamente l'interazione tra TNF α e TNFRI e TNFRII.

Per la prima inibizione ELISA, il dominio extracellulare di TNFRI fuso con la regione Fc delle IgG umane (R&D Systems, Cat. N. 372-RI) è stato applicato su un Maxisorp ELISA a 96 pozzetti a una concentrazione di 0,5 μ g/ml. Per la seconda inibizione ELISA, il dominio extracellulare di TNFRII fuso con la regione Fc delle IgG umane (R&D Systems, Cat. N. 726-R2) è stato applicato a una concentrazione di 2 μ g/ml. Tutte le fasi successive erano identiche per entrambi

i saggi. Per rilevare il legame di TNF α a TNFRI e a TNFRII, TNF α è stato biotinilato prima del suo uso. TNF α umano biotinilato (960 pM, 50 ng/ml) è stato prima incubato con scFv anti-TNF α umanizzati diluiti in serie 3 volte e infliximab (10.000 ng/ml-0,2 ng/ml) per 1 ora a temperatura ambiente. Le miscele di TNF α /frammento di anticorpo sono state trasferite alle piastre immobilizzate del recettore TNF e il legame di TNF α non bloccato al recettore TNF α immobilizzato è stato rilevato dopo incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti con streptavidina-HRP legante la biotina (reagenti SDT, Cat. N. SP40C). L'aggiunta del substrato 3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ha prodotto una lettura colorimetrica proporzionale al legame di TNF α a TNFRI e TNFRII. Prima dell'uso nella competizione ELISA, l'attività biologica di TNF α biotinilato è stata confermata nel saggio L929. L'EC₅₀ di TNF α biotinilato era simile all'EC₅₀ di TNF α non etichettato (dati non mostrati). Analogamente al saggio L929 descritto sopra, i dati sono stati analizzati usando un adattamento della curva logistica a quattro parametri usando il software Softmax Data Analysis (Molecular Devices) e la concentrazione di scFv richiesta per inibire l'interazione di TNF α e TNFR del 50% e del 90% (IC₅₀ e IC₉₀) è stata calcolata.



Per rendere i valori di IC₅₀ e IC₉₀ direttamente confrontabili tra esperimenti effettuati in giorni differenti o su piastre di saggio differenti, i valori di IC₅₀ e IC₉₀ sono stati calibrati contro l'anticorpo di riferimento infliximab.

Per controllare la precisione della risposta, le curve dose-risposta sono state analizzate in duplicato. Le deviazioni standard e le CV sono state calcolate per ciascun punto di misurazione (CV < 25%).

2.1.4 Specificità di bersaglio

Per confermare la specificità degli scFv anti-TNF α , è stato valutato il legame all'elemento della famiglia più omologo, TNF β . Il potenziale di inibire l'interazione di TNF α biotinilato con scFv da parte di TNF β senza etichetta (Peprotech, Cat. N. 300-01 B) e TNF α (Peprotech, Cat. No. 300-01) è stato analizzato mediante ELISA di competizione. A tal fine, gli scFv sono stati applicati su una piastra ELISA Maxisorp a 96 pozzetti a una concentrazione di 1 μ g/ml. È stato rilevato il legame di TNF α biotinilato (75 ng/ml) agli scFv rivestiti in presenza di TNF α non etichettato diluito in serie 5 volte (50 μ g/ml - 0,00013 μ g/ml) o TNF β (1250 μ g/ml - 0,00013 μ g/ml) usando streptavidina legante la biotina-HRP (reagenti SDT, Cat. No. SP40C) come descritto sopra. Per la curva dose-risposta con

TNF α i dati sono stati analizzati usando un adattamento della curva logistica a quattro parametri usando il software Softmax Data Analysis (Molecular Devices) ed è stata calcolata la concentrazione di TNF α senza etichetta richiesta per bloccare l'interazione di TNF α biotinilato con l'scFv rivestito del 50% (IC₅₀). TNF β non mostrava alcuna inibizione significativa dell'interazione tra TNF α biotinilato e scFv (vedere anche Figura 11). Per quantificare il potenziale relativo di TNF β rispetto a TNF α di inibire il legame di TNF α a ciascun scFv, è stato calcolato l'IC₅₀ per inibire l'interazione di TNF β rispetto a TNF α . Poiché non è stata osservata alcuna inibizione significativa quando viene usato TNF β a una concentrazione da circa 5'000 a 20'000 volte superiore rispetto all'IC₅₀ di TNF α , la selettività per il legame a TNF α rispetto a TNF β è stata determinata come significativamente superiore a 5'000-20'000 volte. Per controllare la precisione della risposta, le curve dose-risposta sono state analizzate in duplicato. Le deviazioni standard e le CV sono state calcolate per ciascun punto di misurazione (CV < 25% per tutte le concentrazioni di TNF α / β testate tranne una). Tutti gli scFv soddisfacevano questo criterio.

2.2 Analisi CMC

2.2.1 SDS-PAGE riducente

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) è una tecnica di analisi usata per la caratterizzazione qualitativa e per controllare la purezza delle proteine. Secondo la *United States Pharmacopeia* (USP) (USP Capitolo 1056) l'elettroforesi analitica su gel è un metodo appropriato e di routine per identificare e valutare l'omogeneità delle proteine nelle sostanze farmaceutiche.

Il metodo viene usato per quantificare la quantità di prodotto scFv dai lisati di *E. coli* per ricavare la resa di espressione dopo la fermentazione. Un'altra applicazione del metodo consiste nel verificare l'identità delle sostanze in esame in base al loro peso molecolare rispetto ai valori teorici. A scopo di supporto, questo metodo viene usato per quantificare la purezza dei campioni di prova rispetto alle impurità correlate al processo (proteine della cellula ospite) e alle impurità correlate al prodotto (prodotti di degradazione o addotti).

Le analisi SDS-PAGE sono state effettuate con il sistema di gel prefabbricato disponibile in commercio "Mini Protean" ottenuto da Bio-Rad Laboratories Inc. ScFv umanizzati sono stati analizzati su gel

risolventi "Any kD" (# 456-9036). In entrambi i casi è stato usato il sistema tampone Tris/Glycine consigliato dal produttore. Per la rilevazione delle bande proteiche è stata usata la colorazione coomassie con la soluzione di colorazione SimplyBlue™ (Life Technologies Corp., # LC6060) o la colorazione con argento con il Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., # 24612). Per le procedure di colorazione sono stati seguiti i protocolli del rispettivo fornitore.

La documentazione e l'analisi dei gel proteici colorati è stata effettuata con il sistema di documentazione ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories Inc., # 170-8265) e il software Image Lab, versione 4.0.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., # 170 - 9690).

Determinazione del titolo di campioni di lisato

SDS-PAGE consente il rilevamento specifico della proteina di interesse nella miscela di proteine della cellula ospite. Su ciascun gel è stata inclusa una serie di diluizioni dello standard di riferimento nell'intervallo lineare del metodo (determinato in anticipo). Una regressione lineare delle intensità di banda (misurata mediante densitometria) rispetto alle concentrazioni nominali dello standard di riferimento

è stata usata per calcolare una curva standard, che a sua volta è stata usata per estrapolare il contenuto di scFv nel campione.

I campioni di lisato con concentrazioni di prodotto sconosciute sono stati caricati in differenti diluizioni (almeno 1:10 in tampone di diluizione) per avere almeno una concentrazione di scFv nell'intervallo lineare del metodo. La quantità di prodotto è stata calcolata in base alle intensità di banda misurate di scFv e la concentrazione è stata determinata usando i fattori di diluizione della preparazione del campione. I valori sono stati calcolati come media per tutti i campioni che erano all'interno dell'intervallo lineare della curva standard.

Come ulteriore prova dell'idoneità del metodo per la quantificazione del campione di lisato è stato effettuato un test di inibizione/potenziamento aggiungendo a un campione di lisato una quantità nota di standard di riferimento. Il calcolo del recupero di addizione a una diluizione del campione di 1:10 in tampone di diluizione produceva un valore del 95,4% che è allo stesso livello di precisione di come osservato con lo standard di riferimento nel tampone di diluizione. Pertanto, non è stata osservata alcuna

interferenza significativa della matrice nei lisati cellulari e il metodo è stato ritenuto adatto per la quantificazione del contenuto di scFv nei lisati cellulari.

Purezza e contenuto di proteina

Per mostrare l'idoneità del metodo a determinare il contenuto e quindi anche la purezza dei campioni di prova, il limite inferiore di rilevamento (LOD, Lower Limit Of Detection) per un scFv di riferimento è stato determinato visivamente (identificando la banda proteica) a un caricamento nominale di 0,02 µg, la valutazione dell'istogramma di intensità della rispettiva corsia mostra un rapporto segnale-rumore a questo carico di circa 2. Inoltre, l'intervallo lineare per la quantificazione è stato determinato analizzando densitometricamente le bande principali.

L'adattamento dei dati con una regressione lineare risulta in un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,9998, indicando così una buona qualità dell'adattamento. Oltre alla qualità complessiva dell'adattamento, è stato determinato l'errore relativo di ogni singolo punto di dati per documentare l'idoneità del metodo nell'intervallo selezionato. Gli errori relativi sono inferiori al 10% per tutti i punti di dati che indicano una buona precisione di

questo metodo.

2.2.2 Assorbanza UV a 280 nm

Il metodo di assorbanza UV a 280 nm è un saggio di proteine totali come descritto nel capitolo 1057 dell'USP. Le soluzioni proteiche assorbono la luce UV a una lunghezza d'onda di 280 nm a causa della presenza di amminoacidi aromatici. L'assorbanza UV è una funzione del contenuto di residui di tirosina e triptofano nella proteina ed è proporzionale alla concentrazione proteica. L'assorbanza di una soluzione proteica sconosciuta può essere determinata secondo il capitolo 851 dell'USP sulla spettroscopia applicando la legge di Beer: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, in cui l'assorbanza (A) è uguale al prodotto dell'assorbività molare (ϵ), la lunghezza del percorso di assorbimento e la concentrazione della sostanza. L'assorbività molare per scFv è stata calcolata con il software Vector NTI® (Life Technologies Corporation).

La misura dell'assorbanza UV è stata effettuata con il lettore Infinity M200 Pro dotato di piastra Nanoquant (Tecan Group Ltd.). L'assorbanza dei campioni di proteine è stata misurata a 280 nm e 310 nm, dove quest'ultima lunghezza d'onda fungeva da segnale di riferimento che veniva sottratto dal segnale di 280 nm. Per tenere conto della potenziale

interferenza della matrice del campione è stata effettuata una sottrazione del bianco per ciascuna misurazione. Il segnale di assorbanza finale di un campione proteico ottenuto è stato usato per calcolare la concentrazione proteica usando la legge di Lambert-Beer.

Tutte le misurazioni sono state effettuate entro l'intervallo fornito dalle specifiche dello strumento nell'intervallo di misurazione 0-4 OD, dove una riproducibilità di < 1% e un'uniformità di < 3% è specificato dal produttore.

2.2.3 SE-HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione ad esclusione dimensionale)

La SE-HPLC è una tecnica di separazione basata su una fase stazionaria solida e una fase mobile liquida come delineato dal capitolo 621 dell'USP. Questo metodo separa le molecole in base alla loro dimensione e forma usando una fase stazionaria idrofobica e una fase mobile acquosa. La separazione delle molecole avviene tra il volume vuoto (V_0) e il volume totale di permeazione (V_T) di una colonna specifica. Le misurazioni mediante SE-HPLC sono state effettuate su un sistema Chromaster HPLC (Hitachi High-Technologies Corporation) dotato di iniezione automatica del campione e di un rilevatore UV impostato alla

lunghezza d'onda di rilevamento di 280 nm. L'apparecchiatura è controllata dal software EZChrom Elite (Agilent Technologies, versione 3.3.2 SP2) che supporta anche l'analisi dei cromatogrammi risultanti. I campioni di proteine sono stati eliminati mediante centrifugazione e mantenuti a una temperatura di 6° C nell'autocampionatore prima dell'iniezione. Per l'analisi dei campioni scFv è stata impiegata la colonna Shodex KW402.5-4F (Showa Denko Inc., # F6989201) con una fase mobile salina tamponata standardizzata (50 mM Sodio acetato pH 6.0, 250 mM sodio cloruro) alla portata raccomandata di 0,35 ml/min. Il caricamento di campione di bersaglio per iniezione era di 5 µg. I campioni sono stati rilevati da un rilevatore UV a una lunghezza d'onda di 280 nm e i dati sono stati registrati da una suite di software adeguata. I cromatogrammi risultanti sono stati analizzati nell'intervallo da V_0 a V_T escludendo così i picchi associati alla matrice con tempo di eluizione > di 10 min.

Per garantire una precisione intermedia del metodo, uno standard di riferimento è stato misurato regolarmente all'inizio e alla fine di ciascuna sequenza HPLC. Lo standard di riferimento usato per questo test di idoneità del sistema era uno scFv che



era stato prodotto come lotto ed era stato suddiviso in aliquote per essere usato per ciascun punto temporale di misurazione.

2.2.4 DSF (Fluorimetria a scansione differenziale)

Il metodo DSF è un metodo non compendiale per misurare la denaturazione delle proteine dipendente dalla temperatura. La misura della temperatura di denaturazione termica mediante DSF è stata effettuata con una macchina qPCR MX3005P (Agilent Technologies) controllata con il pacchetto software MX Pro (Agilent Technologies) e dotata di un filtro di eccitazione/emissione impostato a 492/610 nm. Le reazioni sono state impostate in piastre PCR Thermo fast 96 bianche (Abgene; #AB-0600/W). Per la rilevazione della denaturazione di proteine una soluzione stock disponibile in commercio del colorante SYPRO orange (Molecular Probes; # S6650) è stata usata con una diluizione finale di 1:1'000. I campioni di proteine sono stati diluiti per le misurazioni di denaturazione fino a una concentrazione finale di 50 µg/ml in una soluzione salina tamponata standardizzata. La denaturazione termica è stata effettuata mediante un programma di temperatura a partire da 25° C in rampa fino a 96° C a fasi di 1° C con una durata di 30 secondi. Durante il programma di temperatura è stata

registrata l'emissione di fluorescenza di ciascun campione. I dati grezzi registrati sono stati elaborati e valutati con un pacchetto di modelli Microsoft Excel (Niesen, Nature Protocols 2007, vol. 2 n° 9) e i dati di fluorescenza sono stati adattati con un'equazione di Boltzmann usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) per ottenere il punto medio di transizione (T_m).

Al fine di produrre misurazioni affidabili e robuste del punto medio di denaturazione sono state effettuate almeno misurazioni duplicate. Per quanto riguarda la qualità dei dati sono state considerate soltanto misurazioni con una bontà di adattamento (R^2) > 0,9900 e un intervallo di confidenza del 95% della T_m inferiore allo 0,5%.

Per una valutazione della precisione intermedia è stato incluso uno standard di riferimento (noto scFv caratterizzato) in ciascuna misurazione per consentire il confronto delle prestazioni del saggio a giorni differenti.

2.2.5 Studio di stabilità

Al fine di valutare la stabilità di differenti costrutti scFv come lettura per la sviluppabilità di queste molecole, è stato designato un protocollo di studio della stabilità a breve termine. I costrutti

proteici sono stati concentrati in una semplice formulazione salina tamponata (vedere sopra) alle concentrazioni bersaglio di 1 e 10 mg/ml. Il contenuto di monomero è stato determinato mediante SE-HPLC per confermare che la purezza supera i criteri di successo di > 95%. Successivamente i campioni di proteine sono stati conservati a < -65, -20, 4 e 37° C per la durata di 4 settimane e le aliquote sono state analizzate in vari momenti. La lettura primaria è l'analisi mediante SE-HPLC, che consente la quantificazione di oligomeri e aggregati solubili a più alto peso molecolare. Come misure di supporto, il contenuto proteico è determinato dall'assorbanza UV a 280 nm, che fornisce un'indicazione se durante il periodo di conservazione quantità sostanziali di proteine sono state perse per precipitazione. Per la conservazione sono state usate provette con tappo a vite (Sarstedt, Cat. N. 72.692.005) con quantità di riempimento di 30-1500 µg per aliquota. Inoltre, la purezza è determinata da SDS-PAGE che indica la stabilità del costrutto rispetto alla degradazione o alla multimerizzazione covalente.

Esempio 3: Generazione di diabody e IgG umanizzata

Il costrutto di diabody a catena singola è stato

progettato disponendo i domini variabili in una configurazione VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA. In questi costrutti i domini VLA e VHA e VLB e VHB formano congiuntamente il sito di legame per TNF α . I linker peptidici L1-L3 che collegano i domini variabili sono stati costruiti con ripetizioni di glicina/serina. I due linker corti L1 e L3 sono composti da un'unica ripetizione G₄S, mentre il linker lungo L2 è composto dalla sequenza (G₄S)₄. Le sequenze nucleotidiche che codificano i domini variabili umanizzati (Esempio 2; 1.2.1.) sono stati sintetizzati *de novo* e clonati in un vettore adattato per l'espressione di E. coli che si basa su uno scheletro di pET26b (+) (Novagen). L'espressione e la purificazione sono state effettuate come descritto per gli scFv nell'Esempio 2; 1.2.1.

L'IgG umanizzata è stata costruita clonando i domini variabili in un vettore di espressione di mammifero adatto per un'espressione eterologa transitoria contenente una sequenza leader e i rispettivi domini costanti, per esempio i vettori pFUSE-rlgG (Invivogen). L'espressione transitoria dell'IgG funzionale è stata effettuata mediante cotrasfezione di vettori che codificano le catene pesanti e leggere con il sistema FreeStyle™ MAX in cellule CHOS. Dopo la coltivazione per svariati giorni,

il supernatante delle cellule secernenti l'anticorpo è stato recuperato per la purificazione. Successivamente le IgG secrete sono state purificate per affinità dalla proteina A Sepharose (GE Healthcare). Le frazioni di eluizione sono state analizzate mediante SDS-PAGE, assorbanza UV a 280 nm e SE-HPLC.

Le affinità delle molecole di anticorpo sono state determinate usando uno strumento Biacore come descritto nell'Esempio 2 in 2.1.1).

Tabella 10

	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
IgG	$1,90 \times 10^6$	$7,92 \times 10^{-5}$	$4,17 \times 10^{-11}$
scDb	$9,40 \times 10^5$	$2,02 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-11}$
scFv	$8,93 \times 10^5$	$3,38 \times 10^{-5}$	$3,79 \times 10^{-11}$

Le potenze delle molecole anticorpali sono state determinate in un saggio L929 (il metodo è descritto nell'Esempio 2 sotto 2.1.2).

Tabella 11

	Potenza, IC_{50} (nM)
IgG	0,02
scDb	0,01
scFv	0,03

Esempio 4: Determinazione della stechiometria di legame a $TNF\alpha$

La stechiometria di legame di 16-22-H5 a $TNF\alpha$ è stata determinata usando SE-HPLC. 16-22-H5-scFv e $TNF\alpha$

sono stati incubati a due differenti rapporti molari, vale a dire a un rapporto molare 1:1 e 4,5:1. Poiché TNF α esiste come trimero in soluzione, i rapporti molari indicati si riferiscono a TNF α _{trimero}. Pertanto, nel rapporto 4,5:1 il 16-22-H5-scFv è in eccesso e deve occupare tutte le posizioni di legame di TNF α _{trimero} avendo come risultato complessi di 1 TNF α _{trimero} con 3 scFv. Tuttavia, in condizioni equimolari non è presente abbastanza scFv per saturare tutti e 3 i siti di legame teorici di TNF α . Pertanto, sono previste anche varianti complesse con meno di 3 scFv legati. TNF α e 16-22-H5-scFv sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente per consentire la formazione del complesso. I campioni sono stati quindi centrifugati a 4° C per 10 min. 10 μ l di ciascun campione sono stati analizzati su SE-HPLC. L'analisi SE-HPLC è stata effettuata con tampone fosfato 50 mM pH 6,5, NaCl 300 mM come eluente a una velocità di flusso di 0,35 ml/min. I picchi proteici eluiti sono stati rilevati a una lunghezza d'onda di 280 nm. La colonna è stata calibrata in anticipo usando il Gel filtration Calibration Kit di GE Healthcare (LMW, HMW) per la determinazione dei pesi molecolari apparenti.

Il pannello inferiore della Figura 12 mostra il profilo di eluizione con quantità equimolari di scFv e

TNF α che è sovrapposto ai profili del solo TNF α _{trimero} e del solo scFv. A causa della trimerizzazione di TNF α in soluzione vi sono teoricamente fino a tre siti di legame equivalenti per scFv presenti su ciascun trimero e quindi le molecole di scFv sono limitanti. In queste condizioni sono state identificate tutte e tre le specie complesse (3:1, 2:1, 1:1). Il pannello superiore della figura 12 mostra il profilo di eluizione del complesso con quantità eccessive di scFv. L'eccedenza di scFv non legato è eluita al tempo di ritenzione previsto. Il picco di TNF α è stato consumato quantitativamente per la formazione di complessi ed è scomparso completamente. Il picco di questo complesso si è spostato verso tempi di ritenzione inferiori e si correlava bene con il tempo di ritenzione del picco con il peso molecolare più grande della configurazione equimolare. Per questo motivo si è concluso che tutti i siti di legame disponibili sul TNF α erano occupati da scFv e quindi, la stechiometria di legame è 3:1 (scFv:TNF α) se il scFv è disponibile in eccesso.

Oltre a queste osservazioni qualitative, la stechiometria di legame apparente è stata calcolata anche in base al MW apparente del complesso 16-22-H5-scFv:TNF α come determinato mediante SE-HPLC. In base

al tempo di ritenzione, il MW apparente è stato calcolato in 139,7 kDa. Secondo l'equazione (1) sotto, la stechiometria di legame apparente è stata calcolata essere 3,3. Ciò si correla bene con il numero teorico di tre siti di legame equivalenti disponibili per scFv su TNF α _{trimero} e con le osservazioni di cui sopra in cui è stata determinata una stechiometria di legame 3:1.

$$\text{Equazione(1).stechiometria di legame(scFv:TNF}\alpha\text{)} = \frac{\text{MW (complesso app)} - \text{MW (TNF}\alpha\text{ teor)}}{\text{MW (scFv teor)}}$$

MW (complesso app): 139,7 kDa.
 MW (TNF α teor.): 52,2 kDa.
 MW (scFv teor.): 26,5 kDa.

Esempio 5: Formazione di complessi TNF α :anticorpo (reticolazione di TNF α)

La capacità del 16-22-H5-scDb di legarsi simultaneamente a due molecole di TNF α è stata testata su uno strumento Biacore T200 in tampone HEPES contenente HEPES 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 0,05%. Il TNF α biotinilato (Acro Biosystems) è stato catturato tramite un oligo ssDNA biotinilato usando il kit Biotin CAPture (GE Healthcare) secondo le istruzioni del produttore. 0,25 μ g/ml di TNF α biotinilato sono stati iniettati con una velocità di flusso di 10 μ L/min per 3 min per raggiungere un livello di cattura da circa 200 a 300 RU (unità di risonanza). Gli anticorpi 16-22-H5-scDb e 16-22-H5-scFv, come

controllo, sono stati iniettati sulla superficie immobilizzata con TNF α per 2 min a una velocità di flusso di 30 μ L/min a una concentrazione di 90 nM. Dopo l'associazione dei frammenti di anticorpo, TNF α (Peprotech) è stato iniettato per 5 min con una velocità di flusso di 30 μ L/min a 90 nM. Le concentrazioni di anticorpi e TNF α sono state selezionate vicino alla saturazione del legame. La misurazione è stata eseguita a 25° C. La Figura 13 illustra che il 16-22-H5-scDb bivalente è in grado di legare due molecole di TNF α contemporaneamente mentre, come previsto, il 16-22-H5-scFv monovalente si lega soltanto a una molecola di TNF α .

Inoltre, la formazione di complessi anticorpo-TNF α è stata valutata a differenti rapporti di TNF α e formati anticorpali 16-22-H5 usando SE-HPLC. 16-22-H5-IgG (150 kDa) e 16-22-H5-scDb (52 kDa) sono stati incubati con TNF α (52 kDa) a differenti rapporti molari (1:3, 1:1, 3:1) rispetto ai siti di legame. Pertanto, IgG e scDb hanno 2 siti di legame e TNF α ha 3 siti di legame. Le miscele di anticorpo-TNF α sono state incubate per almeno 30 minuti a 37° C, raffreddate per 10 minuti a temperatura ambiente e conservate per una notte a 2-8° C. Da cinque a 10 μ l di miscela proteica a una concentrazione di circa 1

mg/ml sono stati iniettati su una colonna TOSHO TSKgel UP-SW3000. L'analisi è stata effettuata con tampone fosfato 150 mM pH 6,8, NaCl 100 mM come eluente a una velocità di flusso di 0,3 ml/min. I picchi proteici eluiti sono stati rilevati a una lunghezza d'onda di 214 nm. La colonna è stata calibrata in anticipo usando la miscela standard di proteine BEH450 SEC (Waters) per la determinazione dei pesi molecolari approssimativi dei complessi. La Figura 14A mostra la formazione di complessi 16-22-H5-IgG:TNF α . I complessi che sono ≥ 600 kDa indicano la formazione di complessi costituiti da ≥ 2 TNF α e ≥ 3 molecole IgG. La Figura 14B mostra la formazione di complessi 16-22-H5-scDb:TNF α . I complessi che sono ≥ 300 kDa indicano la formazione di complessi costituiti da ≥ 2 molecole di TNF α e ≥ 3 scDb.

Esempio 6: Inibizione della proliferazione cellulare

La capacità di differenti formati di anticorpi di 16-22-H5 e adalimumab di inibire la proliferazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) è stata testata in una reazione linfocitaria mista (MLR). Le PBMC di 2 donatori sani sono state coltivate (RPMI1640) in un rapporto 1:1 in piastre da 96 pozzetti per 48 ore a 37° C/5% di CO₂. Dopo

l'attivazione, le cellule sono state trattate con anticorpi anti-TNF α o anticorpo di controllo IgG (tutti a una concentrazione finale di 10 μ g/ml) in sestuplicato per altri 5 giorni a 37° C/5% di CO₂. 24 ore prima della fine dell'incubazione BrdU (20 μ l/pozzetto) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e la proliferazione è stata determinata misurando l'assorbimento di BrdU usando un ELISA (Roche Diagnostics) per la proliferazione cellulare disponibile in commercio. L'indice di stimolazione è stato determinato calcolando il rapporto di assorbimento di BrdU tra le cellule trattate con anticorpi e le cellule trattate con mitomicina C (25 ng/ml). La Tabella 12 e la Figura 15 illustrano che tutti i formati di anticorpi testati di 16-22-H5 inibivano in modo significativo la proliferazione delle cellule T paragonabile a adalimumab.

Tabella 12

	concentrazione (μ g/ml)	Indice di stimolazione	
		media	DS
IgG di controllo	10	5,2	0,5
Adalimumab	10	2,6**	0,6
16-22-H5-IgG	10	2,5**	0,6
16-22-H5-scDb	10	4,1*	0,7
16-22-H5-scFv	10	4,0**	0,6

*P < 0,05; **P < 0,01;

Esempio 7: Inibizione della secrezione di citochine indotta da LPS

I monociti CD14⁺ in RPM11640 sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti e incubati per 16 ore a 37° C/5% di CO₂ in un incubatore umidificato. Quindi le cellule sono state trattate con anticorpi anti-TNF α o anticorpo di controllo IgG in duplicati per 1 ora usando concentrazioni anticorpali finali comprese tra 2 e 2000 ng/ml. I monociti sono stati lavati 3 volte con terreno di coltura cellulare e successivamente incubati con LPS (100 ng/ml) per 4 ore a 37° C/5% CO₂. Le concentrazioni di IL-1 β e TNF α nei supernatanti della coltura cellulare sono state determinate usando kit ELISA disponibili in commercio (sistemi di ricerca e sviluppo). I risultati sono mostrati nelle tabelle 13 e 14 e nelle figure 16A e B. L'IC₅₀ è stato determinato usando un adattamento della curva logistica a quattro parametri. Per quanto riguarda la secrezione di IL-1 β , i valori di IC₅₀ per 16-22-H5-IgG, 16-22-H5-scDb, 16-22-H5-scFv e adalimumab sono riassunti nella Tabella 13 di seguito.

Tabella 13. Secrezione di IL-1 β

Adalimumab	IC ₅₀ (pg/ml)	IC ₅₀ (nM)
		121,3
16-22-H5-IgG	81,55	0,54
16-22-H5-scDb	30,51	0,59
16-22-H5-scFv	16,98	0,65

Per quanto riguarda la secrezione di TNF α , i

valori di IC₅₀ determinati per 16-22-H5-IgG, 16-22-H5-scDb, 16-22-H5-scFv sono riassunti nella Tabella 14.

Tabella 14. Secrezione di TNF α

Adalimumab	IC ₅₀ (pg/ml)	IC ₅₀ (nM)
		174,0
16-22-H5-IgG	120,5	0,80
16-22-H5-scDb	17,18	0,33
16-22-H5-scFv	13,48	0,52

Tabella 15. Sequenze di consenso Vkl (riorganizzate)

	Posizioni secondo Kabat:	SEQ ID NO:	Sequenza
Cornice I	da 1 a 23	56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
Cornice II	da 35 a 49	57	WYQQKPGQAPKLLIY
Cornice III	da 57 a 88	58	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

Tabella 16: Sequenze di cornice IV basate sulla linea germinale V λ

SEQ ID NO:	Sequenza
59	FGTGTKVTVL
60	FGGGTKLTVL
61	FGGGTQLIIL
62	FGSGTKVTVL

SEQUENCE LISTING	LISTA DI SEQUENZE
Anti-TNF-alpha antibodies and functional fragments thereof	Anticorpi anti-tnf alfa e frammenti funzionali di essi
Artificial Sequence	Sequenza Artificiale
MISC_FEATURE	CARATTERISTICA_MISC
Is	È
Humanized VH domain of clone 16-22-H05-sc02 and clone 16-22-H05-sc04	Dominio VH umanizzato del clone 16-22-H05-sc02 e del clone 16-22-H05-sc04
humanized scFv of clone 16-22-H05-sc02	scFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc02
linker sequence in scFv	sequenza linker in scFv
linker sequence in diabody	sequenza linker in diabody
Humanized diabody of clone 16-22-H05	Diabody umanizzato del clone 16-22-H05
light chain of humanized IgG of clone 16-22-H05	catena leggera di IgG umanizzate del clone 16-22-H05
heavy chain of humanized IgG of clone 16-22-H05	catena pesante di IgG umanizzate del clone 16-22-H05
humanized VL/scFv of clone 16-22-H05-sc04	VL/scFv umanizzato del clone 16-22-H05-sc04
Vkl consensus sequence of framework I (Kabat positions ...)	Sequenza di consenso Vkl del framework I/II/III (posizioni di Kabat...)
V lamda germline-based sequence of framework IV	sequenza basata sulla linea germinale v lambda

SEQUENCE LISTING

<110> Tillotts Pharma AG
<120> Anti-TNF-alpha antibodies and functional fragments thereof
<130> PEP02765TIL
<160> 62
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDR
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Phe, Ser, Gly or Tyr
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Ser, Asn, Thr or Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Gly, Tyr, Ala, Asn or Ser
<400> 1
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10
<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDR
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is Gly, Arg or Gln
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Lys or Thr
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Ala or Glu

<400> 2

Xaa Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Ser or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Ser or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Ser, Thr or Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa is Ser or Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa is Tyr, Phe, Leu or Val

<400> 3

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Ser Asp Gly Xaa Xaa Ala
1 5 10 15

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is Asn or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Asn or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Gly, Cys or Ser

<400> 4

Gly Ile Asp Phe Xaa Xaa Tyr Gly Ile Xaa
1 5 10

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Ala or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Thr or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa is Phe or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa is Asn or His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa is Val or Leu

<400> 5

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Xaa Ile Xaa Asn Xaa Ala Xaa Ser Xaa Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is Val, Ile or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is Ala or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Asp or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Trp or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Gly or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa is Phe, Leu or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is Asp or Asn

<400> 6

Asp Pro Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 7

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 8

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 9

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 10

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 11

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 12

Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized VH domain of clone 16-22-H05-sc02 and clone
16-22-H05-sc04

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized VL domain of clone 16-22-H05-sc02

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

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

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

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

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

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

Leu Gly

<210> 15

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized scFv of clone 16-22-H05-sc02

<400> 15

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 17

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 18

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 19

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 20

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 21

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 22

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 23

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 24

Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 25

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 26

Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 27

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Phe Phe Ala
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 28

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe Ala
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 29

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Asn Ser Asp Gly Ser Leu Ala
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 30

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ile Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 31

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Val Ala
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 32

Gln Ser Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser Thr Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 33

Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Cys
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 34

Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 35

Gly Ile Asp Phe Ser Thr Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 36

Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 37

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 38

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Arg Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 39

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Arg Asn Tyr Ala Asn Ser Leu Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 40

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 41

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 42

Asp Pro Ile Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Leu
1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 43

Asp Pro Val Tyr Ser Ser Asp Trp Gly Tyr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 44

Asp Pro Val Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Leu
1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 45

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

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR

<400> 46

Asp Pro Val Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 47

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

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR

<400> 48

Asp Pro Leu Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker sequence in scFv

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker sequence in diabody

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 51
<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized diabody of clone 16-22-H05

<400> 51

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala
 130 135 140

Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala
 165 170 175

Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser
 180 185 190

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr
 210 215 220

Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 245 250 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 260 265 270

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 275 280 285

Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 290 295 300

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 305 310 315 320

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 325 330 335

Ile Ser Gly Leu Gln Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 340 345 350

Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly
 355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 370 375 380

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 385 390 395 400

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly
 405 410 415

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile
 420 425 430

Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg
 435 440 445

Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 450 455 460

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 465 470 475 480

Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
485 490 495

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
500

<210> 52
<211> 221
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> light chain of humanized IgG of clone 16-22-H05

<400> 52

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

Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

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

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

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

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

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

Leu Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
115 120 125

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195 200 205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 53
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> heavy chain of humanized IgG of clone 16-22-H05

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized VL of clone 16-22-H05-sc04

<400> 54

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

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

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

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

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

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

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

Leu Gly

<210> 55
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized scFv of clone 16-22-H05-sc04

<400> 55

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile
 180 185 190

Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
 195 200 205

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser
 225 230 235 240

Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

245

250

255

Ser

<210> 56
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Vkl consensus sequence of framework I (Kabat positions 1-23)
 <400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Vkl consensus sequence of framework II (Kabat positions 35-49)
 <400> 57

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Vkl consensus sequence of framework III (Kabat positions 57-88)
 <400> 58

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> V lamda germline-based sequence of framework IV

<400> 59

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V lamda germline-based sequence of framework IV

<400> 60

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V lamda germline-based sequence of framework IV

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu
1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V lamda germline-based sequence of framework IV

<400> 62

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo o relativo frammento funzionale in grado di legarsi al fattore di necrosi tumorale umano alfa (TNF α), in cui detto anticorpo o frammento funzionale comprende (i) un dominio VL avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 14 e (ii) un dominio VH avente la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO: 13.

2. Frammento funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è un frammento variabile a catena singola (scFv).

3. Frammento funzionale secondo la rivendicazione 2, in cui detto scFv ha la sequenza amminoacidica come mostrato in SEQ ID NO:15.

4. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, che è un'immunoglobulina G (IgG).

5. Acido nucleico codificante l'anticorpo o il frammento funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

6. Vettore o plasmide comprendente l'acido nucleico secondo la rivendicazione 5.

7. Cellula comprendente l'acido nucleico secondo la rivendicazione 5 o il vettore o il plasmide secondo

la rivendicazione 6.

8. Metodo per preparare l'anticorpo o il frammento funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, comprendente la coltura della cellula secondo la rivendicazione 7 in un terreno in condizioni che consentono l'espressione dell'acido nucleico codificante l'anticorpo o il frammento funzionale, e il recupero dell'anticorpo o del frammento funzionale dalle cellule o dal terreno.

9. Composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo o il frammento funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 e, facoltativamente, un veicolante e/o un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

10. Anticorpo o frammento funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 per l'uso in un metodo di trattamento di un disturbo infiammatorio.

11. Anticorpo o frammento funzionale per l'uso secondo la rivendicazione 10, in cui detto disturbo infiammatorio è un disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale.

12. Anticorpo o frammento funzionale per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è una malattia infiammatoria intestinale.

13. Anticorpo o frammento funzionale per l'uso secondo la rivendicazione 11 o 12, in cui detto disturbo infiammatorio del tratto gastrointestinale è il morbo di Crohn o la colite ulcerosa.

È traduzione conforme al testo originale



FIG. 1	
human framework	cornice umana
Rabbit CDRs	CDR di coniglio
rabbit mAb	mAb di coniglio
Rabbit Fv	Fv di coniglio
Figura 2	
Minutes	minuti
Results	Risultati
Name	Nome
Retention time	Tempo di ritenzione
Area Percent	Area percentuale
Monomeric scFv	scFv monomeric
Dimeric scFv	scFv dimerico
Totals	Totali
Figura 3	
Normalized Fluorescence Intensity	Intensità di fluorescenza normalizzata
Temperature	Temperatura
Figura 4	
Monomer content	Contenuto di monomero
Time [d]	Tempo [d]

Figura 5	
Freeze/thaw (5 cycles)	Congelamento/scongelamento (5 cicli)
Minutes	Minuti
Figura 6	
Monomer content	Contenuto di monomero
Time	Tempo
Storage at 37 °C	Conservazione a 37 °C
% growth	% di crescita
Figura 8	
% growth	% di crescita
Human TNF	TNF umano
Cynomolgus TNF	TNF di cynomolgus
Rhesus TNF	TNF di rhesus
% Binding of TNF to TNFRI	% di legame di TNF a TNFRI
Figura 10	
% Binding of TNF to TNFRII	% di legame di TNF a TNFRII
Figura 12	
Complex	Complesso
TNF α _{trimer}	TNF α _{trimero}
1:1 ratio	Rapporto 1:1
Minutes	Minuti
Figura 13	

Response (0 = capture level)	Risposta (0 = livello di cattura)
Protein injection	Iniezione di proteina
TNF α injection	Iniezione di TNF α
Time	Tempo
Figura 14A	
IgG γ complexes	Complessi di IgG γ
Figura 14B	
scDb γ complexes	Complessi di scDb γ
Figura 15	
Stimulation index	Indice di stimolazione
IgG control	Controllo con IgG
Figura 16A/16B	
Antibody	Anticorpo
IgG control	Controllo con IgG

Figure 1

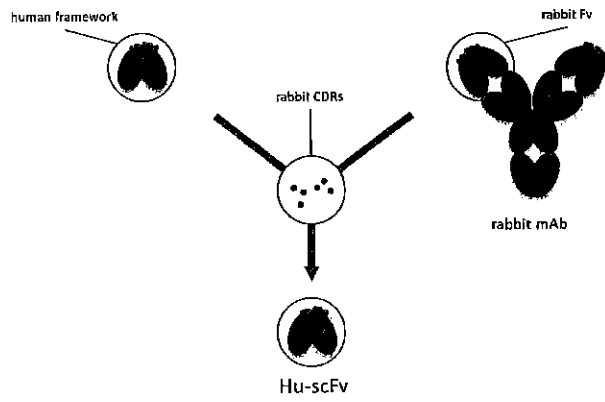


Figure 2

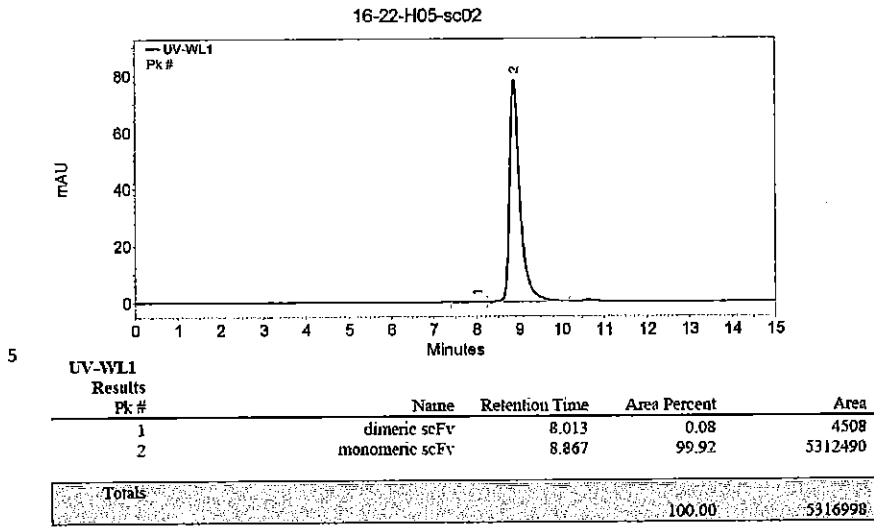
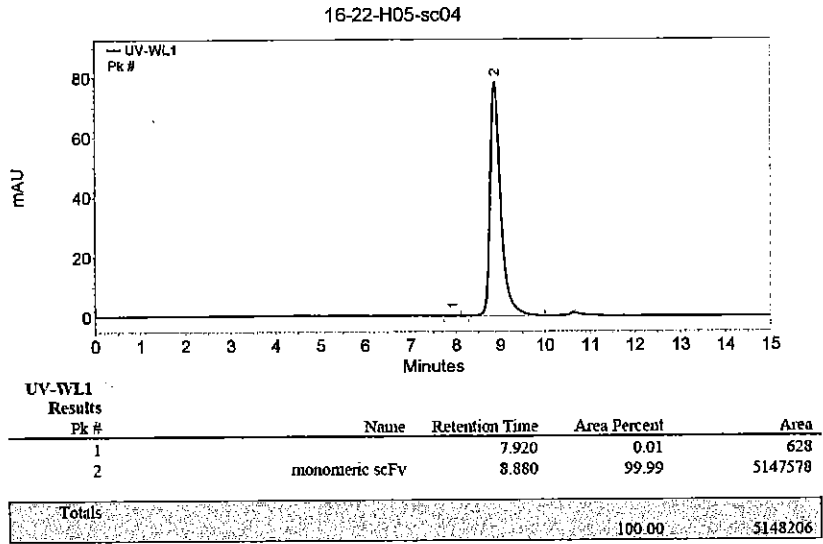
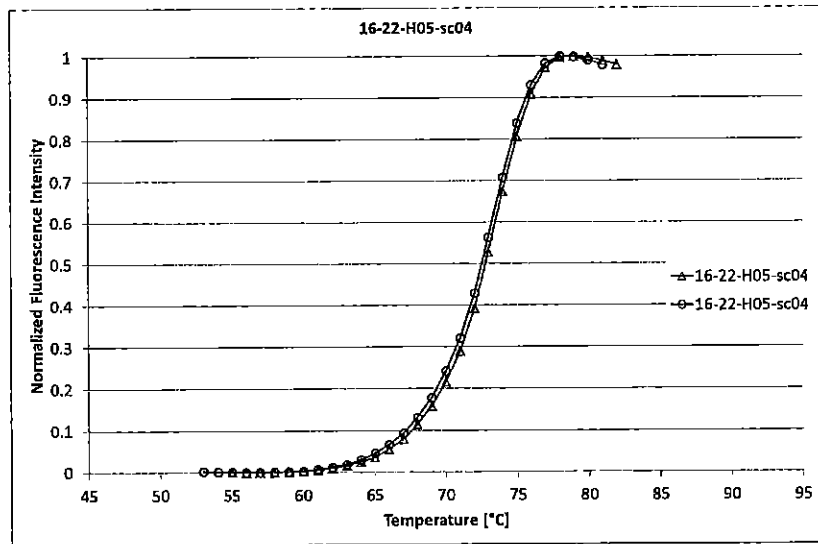
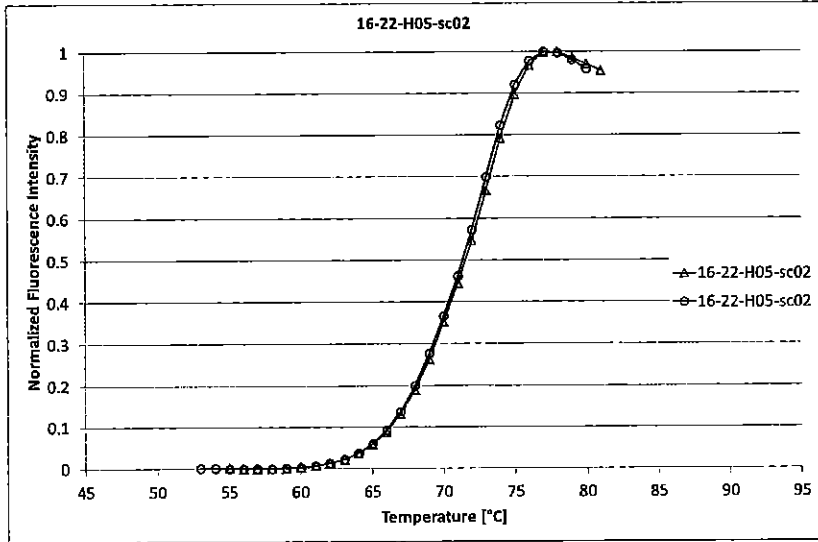


Figure 3



5

Figure 4

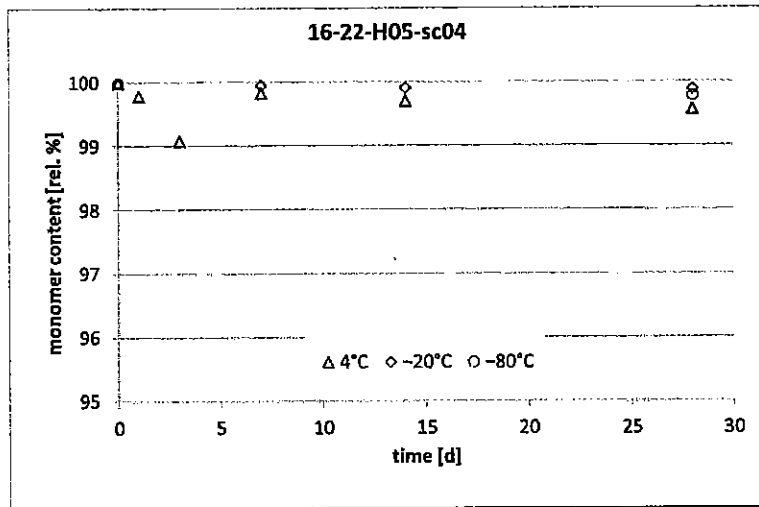
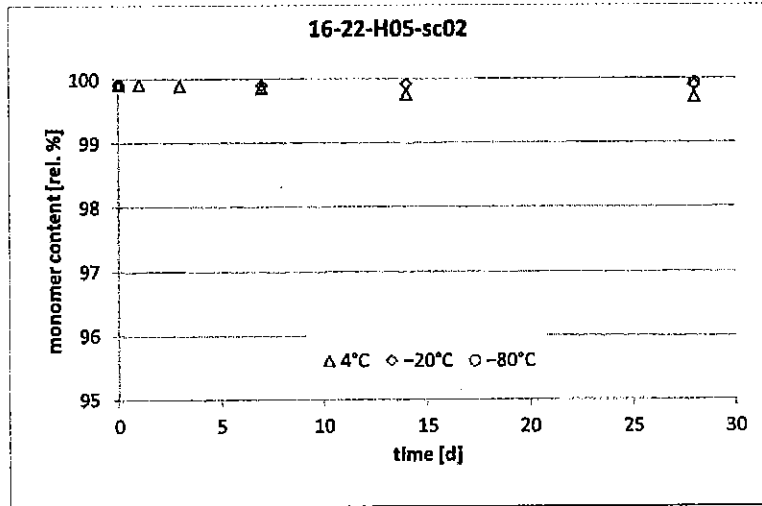


Figure 5

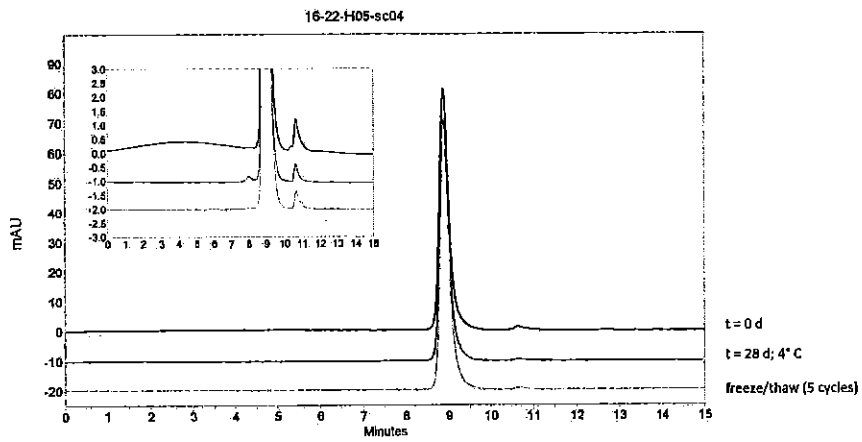
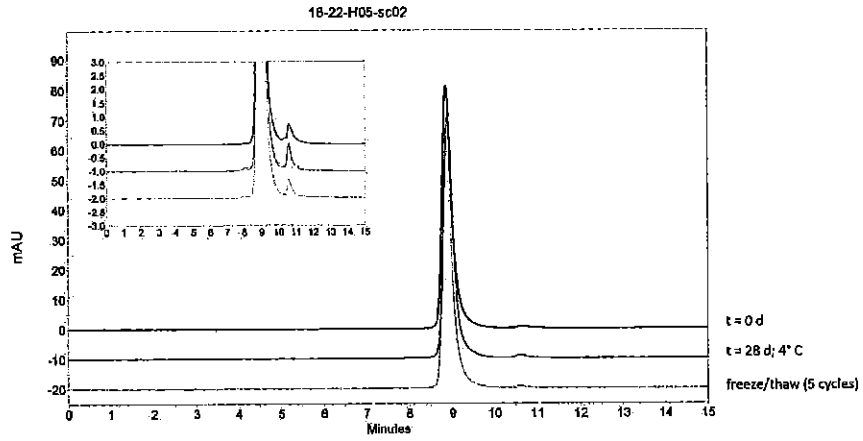
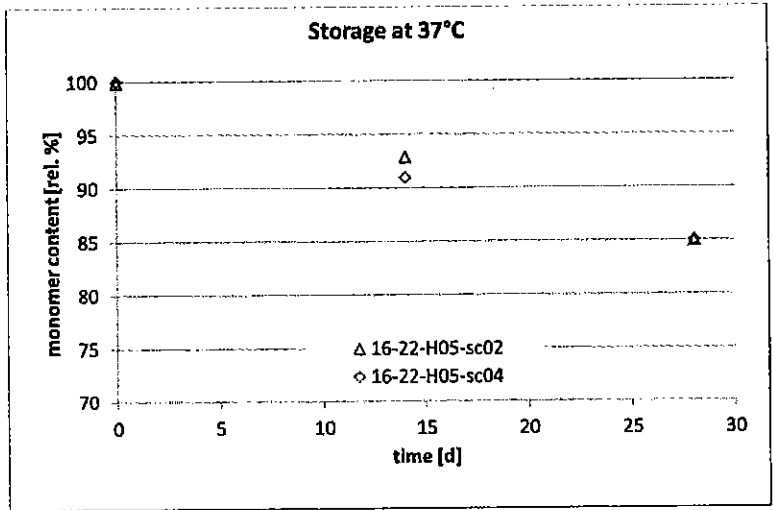


Figure 6



5 Figure 7

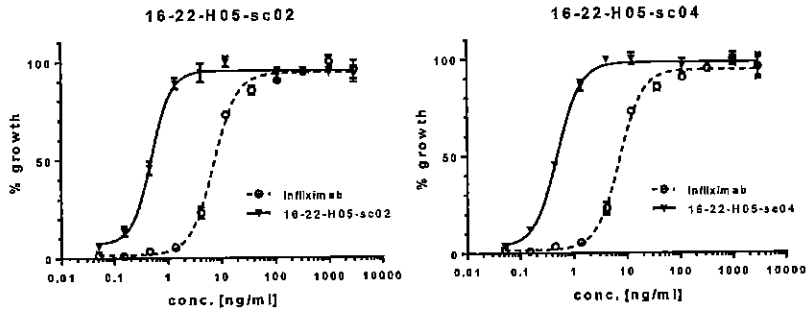
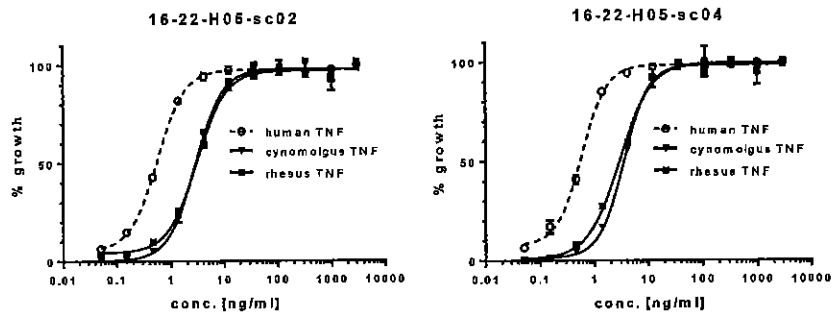


Figure 8



5 Figure 9

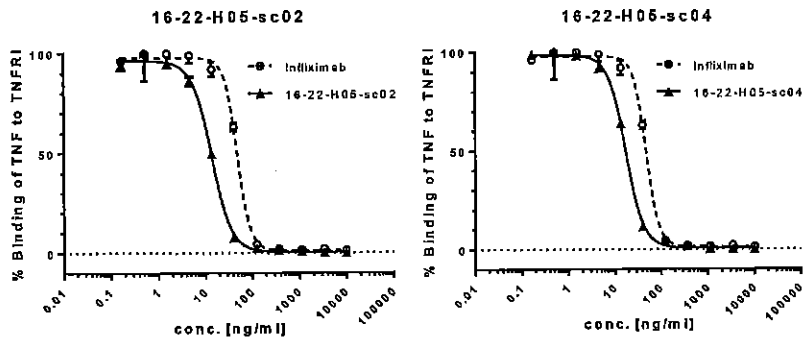
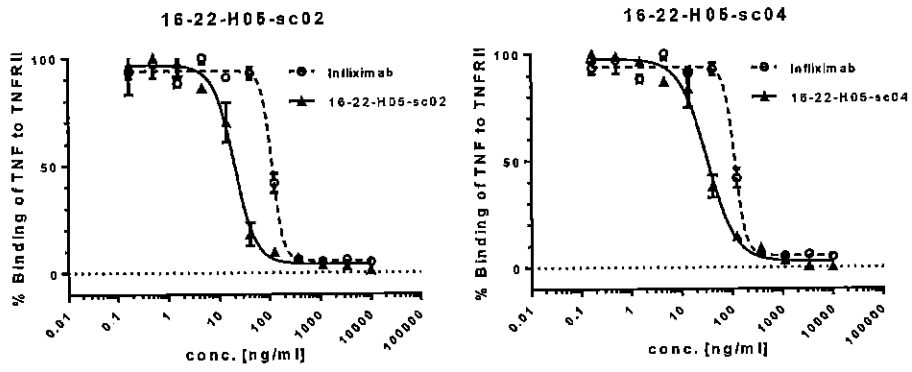


Figure 10



5 Figure 11

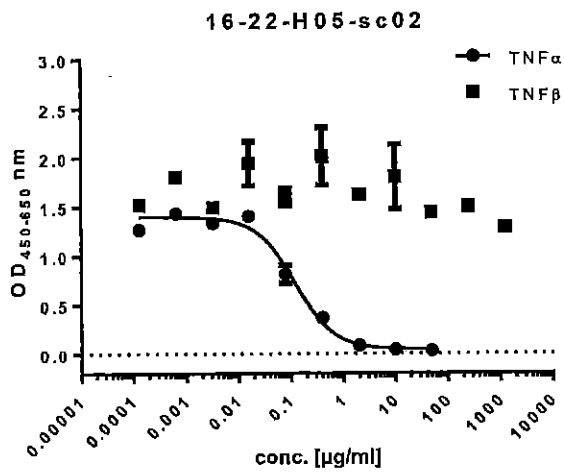


Figure 12

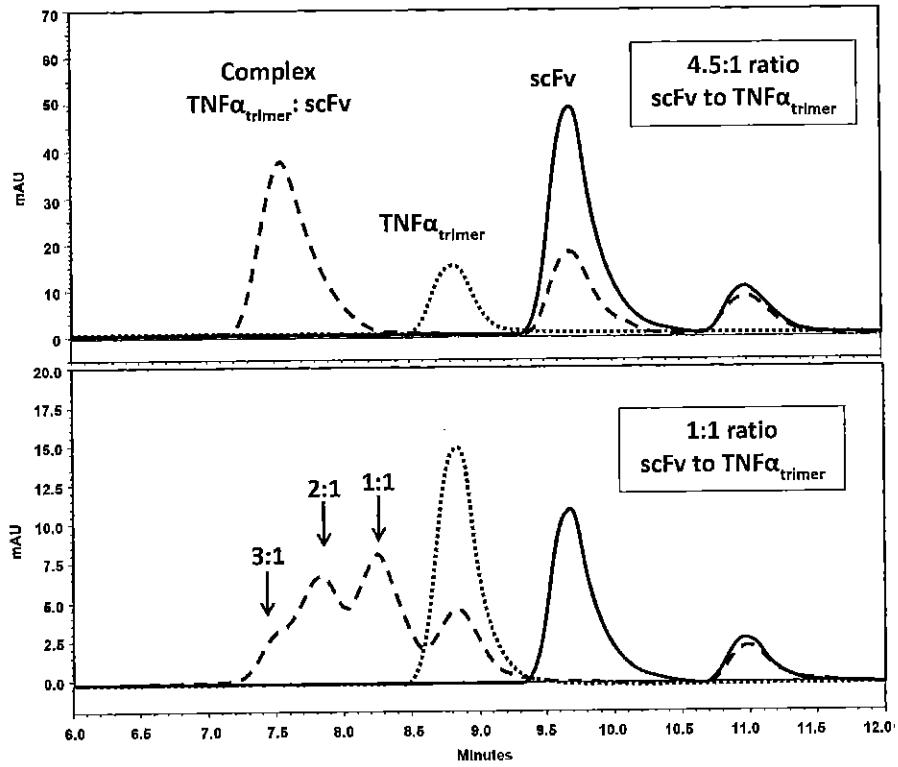


Figure 13

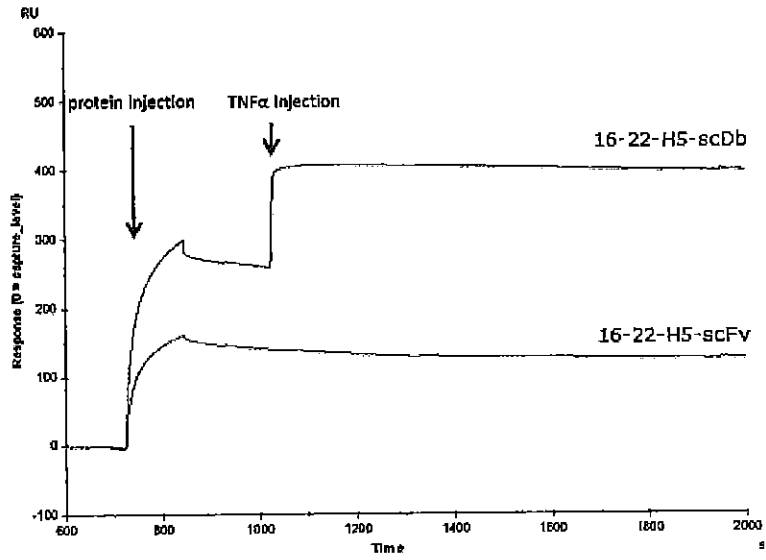


Figure 14A

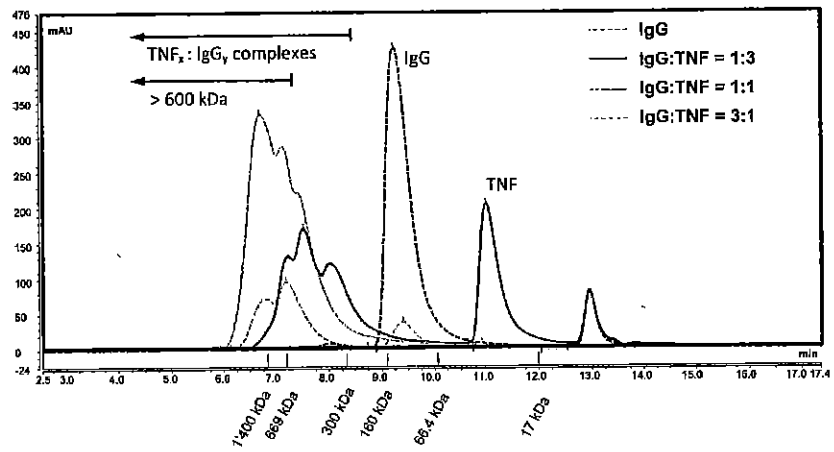


Figure 14B

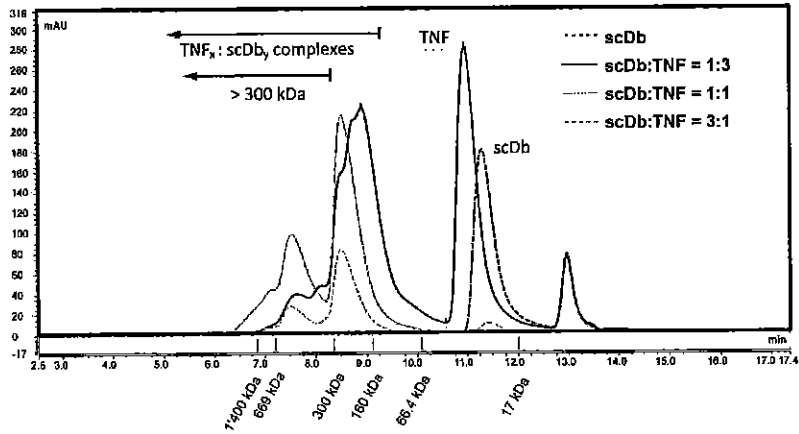
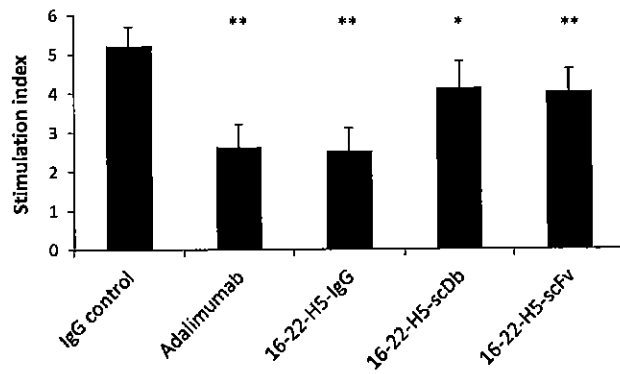


Figure 15



*: $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

Figure 16A

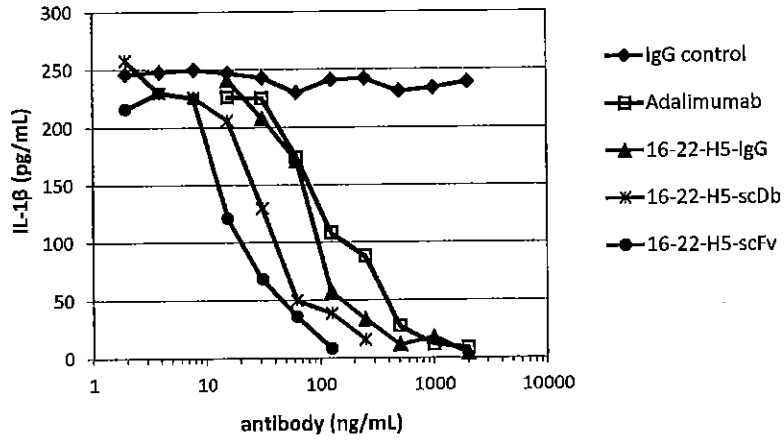


Figure 16B

