



19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 072 330**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12P 21/02, C12N 15/12

C12P 21/08, A61K 38/16

G01N 33/68, G01N 33/577

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90109337.7**

86 Fecha de presentación : **17.05.90**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 398 327**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.90**

54 Título: **Proteína que se fija a factor de Necrosis Tumoral, su purificación y anticuerpos específicos.**

30 Prioridad: **18.05.89 IL 90339**  
**06.08.89 IL 91229**  
**06.04.90 IL 94039**

73 Titular/es: **Yeda Research and Development  
Company Limited**  
**P.O. Box 95**  
**Rehovot 76100, IL**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.07.95**

72 Inventor/es: **Wallach, David;**  
**Engelmann, Hartmut;**  
**Aderka, Dan;**  
**Novick, Daniela y**  
**Rubinstein, Menachem**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.07.95**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

## DESCRIPCION

Esta invención se refiere a una nueva proteína (en lo sucesivo TBP-II) llamada Proteína que se fija a Factor de Necrosis Tumoral (TNF, del inglés Tumor Necrosis Factor), a sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas y mezclas de cualesquiera de los anteriores, que tienen la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF y/o mantener los efectos beneficiosos prolongados de TNF. La invención también se refiere a un procedimiento para la purificación de dicho TBP-II y a la proteína sustancialmente purificada, su clonación y su producción por técnicas de ADN recombinante. La invención también se refiere a anticuerpos frente a TBP-II y a sus fragmentos F(ab). Además, se refiere al uso de sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas y mezclas de cualesquiera de los anteriores, para antagonizar los efectos deletéreos de TNF y/o mantener sus efectos beneficiosos prolongados y al uso de los anticuerpos en ensayos de diagnóstico o como agentes para inhibir o simular los efectos de TNF sobre las células.

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la Linfotoxina (TNF- $\beta$ ) (en lo sucesivo, TNF se refiere tanto a TNF- $\alpha$  como a TNF- $\beta$ ) son citocinas que tienen muchos efectos sobre las células (Wallach, D. (1986) en: Interferon 7 (compilado por Ion Gresser), págs. 83-122, Academic Press, London, y Beutler, B. y Cerami, A. (1987) New England J. Med. 316: 379-385). Tanto TNF- $\alpha$  como TNF- $\beta$  inician sus efectos fijándose a receptores específicos de la superficie de las células. Algunos de los efectos probablemente serán beneficiosos para el organismo: por ejemplo, pueden destruir células tumorales o células infectadas con virus y aumentar las actividades antibacterianas de los granulocitos. De este modo, TNF contribuye a la defensa del organismo frente a agentes infecciosos y a la recuperación después de la agresión. Pero, de modo bastante evidente, tanto TNF- $\alpha$  como TNF- $\beta$  también tienen efectos que pueden ser sumamente perjudiciales. Hay evidencias de que la producción excesiva de TNF- $\alpha$  puede desempeñar un papel patógeno fundamental en diversas enfermedades. Así, ahora se sabe que los efectos de TNF- $\alpha$ , principalmente sobre la vasculatura, son una causa fundamental de los síntomas del choque séptico (Tracey, K.J. y col. (1986) Science 234: 470-474). En algunas enfermedades, TNF puede ocasionar pérdida excesiva de peso (caquexia) porque suprime las actividades de los adipocitos y causa anorexia, así que TNF- $\alpha$  se denominó caquectina. También se describió como un mediador del daño a los tejidos en las enfermedades reumáticas (Beutler, op. cit.) y como un mediador fundamental del daño observado en las reacciones de injerto frente a organismo hospedador.

Por lo tanto, existe necesidad de encontrar la manera de eliminar o antagonizar TNF formado endógenamente o administrado exógenamente. Una tentativa en este sentido fue el aislamiento de una primera Proteína que se fija a TNF, llamada TBP-I, a partir de orina humana y se observó que era capaz de antagonizar los efectos de TNF. Este antagonismo se determinó tanto por medición de la disminución de la actividad citotóxica de TNF, como también por medición de la interferencia de la fijación de TNF a sus receptores.

La proteína TBP-I se describió por primera vez en la Solicitud de Patente Europea EP 308.378 publicada el 22 de Marzo de 1989, en que se describió un procedimiento para su purificación hasta homogeneidad a partir de orina humana por cromatografía sobre CM-Sepharose seguida de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), en columnas Mono Q y Mono S y HPLC en fase inversa. La TBP-I homogénea así obtenida tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 27.000 en electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA)-dodecilsulfato de sodio (DSS) tanto en condiciones reductoras como no reductoras. La homogeneidad de la proteína purificada se confirmó por análisis de microsecuencias, lo que reveló una sola secuencia N-terminal: Asp-Ser-Val-Cys-Pro-. La purificación parcial de proteínas que se fijan a TNF $\alpha$ , aparentemente similares a TBP-I, también fue descrita por Brockhaus y col., 2º Congreso Internacional sobre TNF y citocinas afines (15-20 de Enero de 1989), Abstract WA 140. Hommann y col. (1989), íbid., Abstract WA 143, describe experimentos de reticulación con proteínas receptoras de TNF $\alpha$ , pero no describen el aislamiento ni la purificación de dichas proteínas.

Se observó que TBP-I protegía a las células de la toxicidad de TNF a concentraciones de unos pocos nanogramos por ml e interfería con la fijación de tanto TNF- $\alpha$  como TNF- $\beta$  a las células, cuando se aplicó simultáneamente con estas citocinas. Un examen adicional del mecanismo por el que funciona TBP-I reveló que TBP-I no interacciona con la célula diana, sino que en vez de esto bloquea la función de TNF porque se fija específicamente a TNF, compitiendo así por TNF con el receptor de TNF.

Consecuentemente a este hallazgo, se ha intentado una estrategia alternativa para la purificación de TBP-I, por la que se aplicaron proteínas de orina, o sus fracciones, sobre una columna de TNF inmovilizado y, después de separar las proteínas no fijadas, se eluyeron las proteínas que se fijaron a la columna, en forma biológicamente activa, por una disminución del pH. En el análisis EGPA-DSS, la mayor parte

de la proteína en el eluato se movió como una sola banda ancha con tamaño molecular aparente de 30.000 ± 2.000.

5 Cuando se sometieron a fraccionamiento adicional por HPLC en fase inversa, las proteínas que elu-  
yeron de la columna de TNF indicaron la presencia de dos componentes activos: uno, TBP-I, que eluye  
como es de esperar a una concentración de acetonitrilo de 27% y, además, una segunda proteína que se fija  
a TNF, denominada TBP-II, que eluye a una concentración de acetonitrilo algo más elevada (31%). Esta  
proteína que se fija a TNF es nueva y se llama aquí TBP-II. Ambas proteínas proporcionan protección  
10 contra el efecto citocida in vitro de TNF y ambos se fijan a TNF-β menos eficazmente que TNF-α. Aun-  
que en el análisis de EGPA-DSS las dos proteínas, TBP-I y TBP-II, parecían tener un tamaño molecular  
muy similar, se pudieron distinguir claramente una de la otra por la falta de reactividad cruzada in-  
munológica, por las diferentes secuencias de aminoácidos N-terminales y por las diferentes composiciones  
de aminoácidos.

15 La presente invención proporciona una Proteína que se fija a TNF, llamada aquí TBP-II, sus sales,  
derivados funcionales, precursores y fracciones activas y mezclas de cualesquiera de los anteriores, que se  
fija a TNF específicamente y puede antagonizar los efectos deletéreos de TNF y/o mantener sus efectos  
beneficiosos prolongados. El antagonismo con respecto a TNF se determina midiendo selectivamente  
20 la disminución de actividad citotóxica de TNF, pero no de otros compuestos con algunas actividades  
similares a TNF, tales como interleucina-1 humana (IL-1).

La invención se refiere a dicha TBP-II en forma sustancialmente purificada, que está libre de impure-  
zas proteicas y que se mueve como un solo pico en HPLC en fase inversa.

25 La invención también se refiere a un procedimiento para la purificación de TBP-II a partir de fluidos  
humanos, tales como orina.

Otro objeto de la invención es la producción de TBP-II por técnicas de ADN recombinante, que  
incluyen la preparación de secuencias de ADN que codifican TBP-II o de una proteína sustancialmente  
30 homóloga con ella, la construcción de vehículos de expresión que las contienen y de células hospedadoras  
transformadas con ellos, y el cultivo de dichas células transformantes en un medio adecuado de cultivo  
con el fin de producir TBP-II recombinante o una proteína sustancialmente homóloga con ella.

35 Otro objeto de la invención es proporcionar anticuerpos específicos para TBP-II y sus fragmentos  
F(ab), que se pueden utilizar en diagnóstico así como en productos farmacéuticos tanto para inhibir  
efectos tóxicos de TNF como para simular efectos beneficiosos de TNF en las células.

El TBP-II de la invención y sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas, y mezclas  
de cualesquiera de los anteriores, son para uso como ingredientes activos de composiciones farmacéuticas  
40 para proteger mamíferos contra los efectos deletéreos de TNF y/o mantener sus efectos beneficiosos pro-  
longados, cuando se utilizan junto con TNF.

Las figuras muestran:

45 La Figura 1 muestra la representación de la elución de proteínas que se fijan a TNF de la orina en  
una columna HPLC de fase inversa.

La Figura 2 muestra el análisis EGPA-DSS de las preparaciones crudas y purificadas de TBP-I y  
TBP-II.

50 La Figura 3 representa las secuencias de varios péptidos trípticos de TBP-II.

La Figura 4 muestra el ELISA para la fijación de antisueros contra TBP-I y TBP-II para las dos  
especies de TBP.

55 La Figura 5 muestra la inhibición de la fijación de TNF a diferentes líneas de células con antisueros  
frente a TBP-I y TBP-II.

60 La Figura 6 muestra los niveles de TBP-II en los sueros de individuos sanos y de pacientes con lupus  
eritematoso sistematizado (LES).

La Figura 7 muestra los efectos de diferentes concentraciones de TBP-II en el mantenimiento de la

función beneficiosa prolongada de TNF como estimulador del crecimiento fibroblástico (células FS11).

La Figura 8 muestra los efectos de TBP-II sobre la actividad biológica de TNF en función del tiempo.

5 La presente invención proporciona Proteína que se fija a TNF, TBP-II, sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas, y mezclas de cualesquiera de los anteriores, que inhiben selectivamente el efecto citotóxico de TNF y/o mantienen sus efectos beneficiosos prolongados.

10 De acuerdo con la presente invención se encontró que TBP-II es capaz de inhibir la actividad citotóxica de TNF, así que la inhibición de los efectos citotóxicos de TNF por TBP-II está dentro del alcance de la presente invención. Además se encontró que TBP-II tiene un papel adicional como un vehículo específico que se fija a TNF y mantiene sus efectos beneficiosos prolongados. Así, el complejo TNF-TBP-II fijado puede actuar como un depósito que proporciona una liberación sostenida de TNF activo a las células diana. Este aspecto también está dentro del alcance de la presente invención, inclu-  
15 yendo el uso de TBP-II en pequeñas cantidades junto con TNF, para promover los efectos beneficiosos de TNF, tales como actividad antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiparasitaria o estimuladora del crecimiento fibroblástico. En este caso, la mezcla puede tener diversas aplicaciones clínicas, tales como estimulación de la curación de heridas.

20 La TBP-II de la invención se aisló a partir de orina humana. La proteína sustancialmente purificada, que está sustancialmente libre de impurezas proteicas, tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa cuando se analiza por EGPA-DSS en condiciones reductoras y se mueve como un solo pico en HPLC en fase inversa. Su actividad se determina midiendo la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF- $\alpha$  sobre células A9 murinas.

25 TBP-II se caracteriza además por la siguiente secuencia obtenida por análisis de la secuencia N-terminal de la proteína:

30 Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys

35 En efecto, se pudo observar una heterogeneidad de secuencias N-terminales en la muestra de TBP-II, y en todos los experimentos se pudieron discernir formas truncadas de esta secuencia. las cantidades de las diferentes secuencias truncadas y la relación entre ellas variaba de lote a lote. Así, junto con la secuencia anterior, se pudo discernir una secuencia cinco aminoácidos más corta:

Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr...

y una secuencia que carecía de los cuatro primeros aminoácidos terminales:

40 Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr...

45 La presente invención abarca una proteína que comprende la secuencia anterior, denominada aquí TBP-II, así como cualquier otro polipéptido en que uno o más aminoácidos en la estructura de TBP-II natural están suprimidos o sustituidos por otros aminoácidos, o uno o más aminoácidos están añadidos a ella, con tal que tengan actividad de TBP-II humana.

50 Esta invención también se refiere a un procedimiento para aislar TBP-II a partir de un fluido humano, v.g., orina, y su purificación. En una realización preferida, la proteína sustancialmente purificada de la invención se produce por un procedimiento que comprende:

- a) recuperar la fracción de proteína bruta a partir de un concentrado dializado de orina humana de pacientes sanos;
- 55 b) someter dicha fracción de proteína bruta de la etapa (a) a purificación por afinidad en una columna de TNF inmovilizada;
- c) someter dichas Proteínas que se fijan a TNF, activas, purificadas por afinidad, de la etapa (b) a HPLC en fase inversa para obtener fracciones activas, sustancialmente purificadas, de las Proteínas que se fijan a TNF, definidas por su capacidad para inhibir el efecto citotóxico de TNF;
- 60 d) separar las proteínas sustancialmente purificadas de la etapa (c) con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa en EGPA-DSS en condiciones reductoras, que se mueven como un solo pico en HPLC en fase inversa y con la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF; y

- e) recuperar las fracciones que eluyen en acetonitrilo al 31% y que contienen TBP-II sustancialmente purificada.

La invención se refiere además a la preparación de TBP-II por técnicas de manipulación genética y abarca todas las herramientas utilizadas en estas técnicas. Así, la invención se refiere a moléculas de ADN que comprenden la secuencia nucleotídica que codifica TBP-II o una proteína sustancialmente homóloga con ella. Estas moléculas de ADN pueden ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético y combinaciones de ellos.

La clonación de TBP-II se puede llevar a cabo por diferentes técnicas. De acuerdo con una estrategia, se producen anticuerpos específicos (policlonales o monoclonales) frente a TBP-II y se utilizan para buscar células que producen TBP-II por inmunofluorescencia o por manchado Western. Después, se extrae ARNm a partir de estas células que producen TBP-II y se convierte en ADNc poniéndolas en contacto con transcriptasa inversa durante un tiempo y en condiciones adecuadas para formar dicho ADNc. El ADNc se clona en un vector de expresión tal como lambda gT 11 y se hace un barrido del mismo utilizando los anticuerpos. El vector de expresión lambda gt 11 se puede utilizar para la inserción de ADN de hasta 7 kb de longitud en un sitio EcoRI único 53 bases curso arriba del codon de terminación de  $\beta$ -galactosidasa. Por lo tanto, se pueden insertar secuencias foráneas de ADN en este sitio y expresar en condiciones apropiadas como proteínas de fusión. El vector de expresión lambda gt 11 es particularmente útil para la construcción de bancos de ADNc que se han de barrer con sondas de anticuerpos (Huynh. T.V. y col. en una compilación de David Glover, *DNA Cloning Techniques: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1984), págs. 49-78).

Siguiendo otra estrategia, se produce un oligonucleótido sintético o una mezcla de oligonucleótidos sintéticos, cuya secuencia se deriva de la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la proteína, v.g., la secuencia N-terminal de aminoácidos, y se utiliza como una sonda para clonar el ADNc o el ADN genómico que codifica TBP-II. Preparaciones adecuadas de ADN, tales como ADN genómico humano, se cortan enzimáticamente con enzimas de restricción, o se recortan al azar y los fragmentos se insertan en vectores recombinantes apropiados para formar una genoteca. Después, estos vectores se pueden someter a barrido con sondas oligonucleotídicas sintéticas con el fin de identificar una secuencia que codifica TBP-II.

Alternativamente, el ARNm se aísla a partir de células que expresan TBP-II y se convierte, después de la purificación, en ADNc como se ha descrito anteriormente. El ADNc se convierte en el ADNc bicatenario por técnicas conocidas, se clona y los clones resultantes se someten a barrido con una sonda apropiada para ADNc que codifica las secuencias deseadas. Una vez que se aísla el clon deseado, el ADNc, se manipula sustancialmente de la misma manera que el ADN genómico. Sin embargo, con ADNc no habrá intrones o secuencias interventoras.

La invención también se refiere a oligonucleótidos sintéticos que se utilizarán como sondas para el ADN que codifica TBP-II. Se sintetizan por métodos conocidos sobre la base de la secuencia de aminoácidos de fragmentos de TBP-II. Para este fin, es posible efectuar el análisis de la secuencia de la TBP-II intacta u obtener sus fragmentos peptídicos y caracterizar su secuencia de aminoácidos. Los fragmentos peptídicos se obtienen sometiendo preparaciones de proteínas purificadas a fragmentación, v.g., por digestión con proteasas tales como tripsina, quimotripsina o papaína por métodos bien conocidos en la técnica (Oike, Y. y col. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:9751-9758), se separan por HPLC en fase inversa y se secuencian por técnicas automáticas de secuenciación de aminoácidos.

Una vez que se han secuenciado uno o más fragmentos peptídicos o que está determinada una secuencia parcial de la proteína, se examinan las secuencias de ADN capaces de codificarlas. Debido a la degeneración del código genético, se puede utilizar más de un codon para codificar un aminoácido particular y se pueden producir uno o más oligonucleótidos diferentes, cada uno de los cuales sería capaz de codificar los fragmentos peptídicos TBP-II (Watson, J.D., en: *Molecular Biology of the Gene*, 3<sup>a</sup> ed. W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, CA (1977), págs. 356-357). Sin embargo, sólo un miembro del conjunto contiene la secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen. Su presencia dentro del conjunto y su capacidad de hibridarse a ADN incluso en presencia de los otros miembros del conjunto, hace posible emplear el conjunto no fraccionado de oligonucleótidos de la misma manera en que se emplearía un oligonucleótido aislado para clonar el gen que codifica el péptido. El uso de dicho oligonucleótido o conjunto de oligonucleótidos que contiene la secuencia teórica "más probable" capaz de codificar los fragmentos del gen de TBP-II (siguiendo las "normas sobre el uso de códones" descritas por Lathe, R. y col. (1985) *J. Molec. Biol.* 183: 1-12) permite identificar la secuencia de un oligonucleótido o conjunto de oligonucleótidos complementarios que es capaz de hibridarse a la secuencia "más probable" que codifica la TBP-II o al menos una porción de la misma, o un conjunto de dichas secuencias. Después

se sintetiza este oligonucleótido que contiene dicha secuencia complementaria y se emplea como una sonda para identificar y aislar una molécula de ADN que codifica la TBP-II de la invención a partir de un banco de ADN (Maniatis, T. y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Gold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982).

5

En una de las realizaciones, el aislamiento del gen de TBP-II se hace por técnicas de hibridación de colonias en condiciones rigurosas. Los procedimientos para la hibridación de ácidos nucleicos son conocidos y están descritos, por ejemplo, en Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, op. cit. y en Haymes, B.T. y col., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1985). Por hibridación con las sondas del nucleótido o conjunto de oligonucleótidos anteriores, es posible identificar en un banco de ADNc o genómico, las secuencias de ADN capaces de experimentar dicha hibridación y después se analizan para determinar en qué medida contienen secuencias codificantes para la TBP-II de la invención.

10

El ADN de clones positivos se inserta después en vectores de expresión apropiadamente construidos por técnicas bien conocidas en este campo (véase Maniatis y col., op. cit.). El ADNc de doble hebra se une a vectores plasmídicos por unión cola con cola homopolimérica o por unión con restricción que implica el uso de enzimas de ADN sintéticos o técnicas de ligación de extremos romos. Se utilizan ligasas de ADN para ligar las moléculas de ADN y se evita unión indeseable por tratamiento con fosfatasa alcalina.

15

Para la expresión de la proteína deseada, el vector de expresión habrá de comprender también secuencias nucleotídicas específicas que contienen información reguladora de la transcripción y la traducción ligada al ADN que codifica la proteína deseada de tal modo que permite la expresión del gen y la producción de la proteína. Primero, con el fin de que el gen sea transcrito, debe estar precedido por un promotor reconocible por la polimerasa de ARN, al que se une la polimerasa y de este modo inicia el procedimiento de transcripción. Hay una gama de dichos promotores en uso, que actúan con eficacias diferentes (promotores fuertes y débiles), que son diferentes para células procarióticas y eucarióticas. Se consiguen altos niveles de expresión del gen en células procarióticas utilizando también sitios que se fijan a ribosomas, tales como la secuencia de Shine-Dalgarno (secuencia SD). Para hospedadores eucarióticos, se pueden utilizar diferentes secuencias reguladoras de transcripción y traducción, dependiendo de la naturaleza del hospedador. Se pueden derivar de fuentes virales, tales como adenovirus, papilomavirus bovino, virus Simian o similares, donde las señales reguladoras están asociadas con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Ejemplos son el promotor TK del virus Herpes, el promotor precoz de SV40, el promotor del gen gal4 de levadura, etc. Se pueden elegir señales reguladoras de la iniciación de la transcripción que permitan la represión y la activación, de modo que la expresión de los genes se pueda modular.

20

25

30

35

La molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la TBP-II de la invención precedida por una secuencia de nucleótidos de un péptido señal y las señales reguladoras de la transcripción y la traducción operablemente unidas se inserta en un vector que es capaz de integrar las secuencias génicas deseadas en el cromosoma de la célula hospedadora. Las células que han integrado establemente el ADN introducido en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo también uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedadoras que contienen el vector de expresión.

40

45

En una realización preferida, la molécula de ADN introducida se incorporará en un vector plasmídico o viral capaz de replicación autónoma en el hospedador receptor. Los plásmidos procarióticos y eucarióticos son bien conocidos en la bibliografía. Factores de importancia para seleccionar un vector plasmídico o viral particular incluyen la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector se pueden reconocer y seleccionar a partir de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un hospedador particular; y de si es deseable que sea capaz de "lanzar" el vector entre células hospedadoras de especies diferentes.

50

Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene el o los productos de construcción se ha preparado para la expresión, el o los productos de construcción de ADN se pueden introducir en una célula hospedadora apropiada por cualquiera de una gama de medios adecuados: transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc. Las células hospedadoras que se han de utilizar en esta invención pueden ser procarióticas o eucarióticas. Los hospedadores procarióticos preferidos incluyen bacterias tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, etc. El hospedador procariótico más preferido es *E. coli*. En estas condiciones, la proteína no será glicosilada. El hospedador procariótico debe ser compatible con el replicón y las secuencias de control en el plásmido de expresión. Los hospeda-

60

dores eucarióticos preferidos son células de mamíferos, v.g., células humanas, de monos, ratones y células de ovario de hámster chino (CHO), ya que proporcionan modificaciones post-traducción a moléculas de proteína, incluyendo plegamiento correcto o glicosilación en sitios correctos. También las células de levadura pueden llevar a cabo modificaciones peptídicas post-traducción, incluyendo glicosilación.

5

Después de la introducción del vector, las células hospedadoras se cultivan en un medio selectivo, que selecciona la propagación de células que contienen el vector. La expresión de la o las secuencias génicas clonadas da como resultado la producción de la TBP-II deseada o uno de sus fragmentos. Después, la proteína expresada se aísla y purifica de acuerdo con el método de purificación descrito en la presente solicitud o por cualquier otro procedimiento convencional que implica extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similares.

10

Un procedimiento de purificación adicional que se puede utilizar preferentemente para purificar la proteína de la invención es la cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-TBP-II, que se producen e inmovilizan en una matriz de gel contenida dentro de una columna. Los preparados impuros que contienen la proteína recombinante se hacen pasar a través de la columna. La proteína se fijará a la columna por el anticuerpo específico mientras que las impurezas pasarán a través de ella. Después del lavado, la proteína se eluye del gel por un cambio en el pH o la fuerza iónica.

15

El término “sales” como se utiliza aquí se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula de proteína, formadas por medios conocidos en la técnica. Las sales de un grupo carboxilo incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sodio, calcio, y sales con bases orgánicas, como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales y sales con ácidos orgánicos.

20

25

La expresión “derivados funcionales” como se utiliza aquí abarca derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se encuentran como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N o C-terminales, por medios conocidos en la técnica y se incluyen en la invención con tal que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres alifáticos o amidas de los grupos carboxilo y derivados N-acilados de grupos amino libres o derivados O-acilados de grupos hidroxilo libres de los restos de aminoácido formados con restos acilo (v.g., grupos alcanófilo o arofilo carbocíclicos).

30

35

“Precusores” son compuestos formados antes que, y que se convierten en, TBP-II en el cuerpo humano o animal. Como “fracciones activas” de la proteína sustancialmente purificada, la presente invención abarca cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o restos unidos a ellas, por ejemplo, restos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o de los restos mismos de azúcar, siempre que dicha fracción tenga la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF sobre las células y/o mantener su efecto beneficioso prolongado.

40

La invención se refiere además a anticuerpos frente a TBP-II y a sus fragmentos F(ab) y sus sales, derivados funcionales y/o fracciones activas (como se han definido aquí antes). Estos anticuerpos proporcionan una nueva estrategia para la modulación de la actividad de TNF, y se pueden utilizar tanto para inhibir como para simular los efectos de TNF sobre subconjuntos específicos de células, dependiendo de la forma molecular de los anticuerpos, específicamente de su valencia: siendo inhibidoras las formas monovalentes de los anticuerpos (v.g. fragmentos F(ab)) y siendo capaces de simular al menos parte de los efectos de TNF las formas multivalentes. De este modo, son adecuados como agentes farmacéuticos tanto para simular como para bloquear los efectos de TNF sobre las células.

45

50

La interacción funcional de los anticuerpos de la presente invención con TBP-II proporciona también una nueva herramienta diagnóstica, basada en inmunoensayos tales como radioinmunoensayo, ELISA, etc., para la detección de la super- o infra-producción de TBP-II por células en el cuerpo en ciertas enfermedades. Así, se puede determinar de este modo el nivel de TBP-II en sueros de pacientes con diferentes tipos de cáncer o que padecen enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistematizado (LES). En una estrategia inversa, los anticuerpos frente a TBP-II, cuando se producen endógenamente en el cuerpo, se medirán utilizando TBP-II purificado. La detección de estos autoanticuerpos, cuando se forman en ciertas enfermedades autoinmunes, es de extrema importancia, ya que su aptitud para simular o inhibir los efectos de TNF tiene con toda seguridad presencia de mucho alcance sobre los síndromes patológicos de dichas enfermedades.

55

60

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se pueden producir en conejos, ratones u otros animales, o em células cultivadas en tejidos, derivadas de ellos, o pueden ser productos de células de origen humano. También se pueden producir por tecnología de ADN recombinante ya sea en una forma idéntica a la del anticuerpo nativo o como moléculas quiméricas, construidas por recombinación de moléculas de anticuerpo de orígenes humano y animal inferior o en otras formas elegidas para hacer los anticuerpos sumamente adecuados para uso en terapia.

Para la preparación de los anticuerpos, cualquiera de TBP-II purificado o uno o más péptidos sintéticos idénticos a la secuencia conocida de uno de sus fragmentos, v.g. a la secuencia proteica N-terminal, se puede utilizar para inmunizar a los animales. Una posibilidad adicional es fusionar una de las posibles secuencias nucleotídicas codificantes de un fragmento de TBP-II al gen codificante de Proteína A, expresar el gen fusionado de Proteína A-TBP-II en *E. coli*, purificar la proteína fusionada por cromatografía de afinidad en una columna de IgG Sepharose y después utilizarla para inmunizar animales.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se preparan utilizando la técnica convencional de los hibridomas (Kohler y col. (1975) *Nature* 256:495; Kohler y col. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6:511). Después de la inmunización, se aíslan células de bazo solas o junto con células de ganglios linfáticos de los animales inmunizados y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT y después se clonan. Las células de hibridoma obtenidas a través de dicha selección después se ensayan para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de captar TBP-II. Después de la identificación, los clones deseados se propagan en masa, ya sea por cultivo en suspensión o en fluido ascítico, inyectando las células en el peritoneo de ratones hospedadores adecuados. Después, se aíslan y purifican los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas.

Como se ha mencionado antes, los anticuerpos monoclonales también se pueden inmovilizar y utilizar para la purificación de la TBP-II en un procedimiento de purificación por afinidad utilizando una columna de inmunoabsorbente.

La TBP-II y sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas y mezclas de cualesquiera de los anteriores, están indicadas para antagonizar los efectos deletéreos de TNF en mamíferos, es decir, para tratar procesos en que se forma endógenamente o se administra exógenamente exceso de TNF. También están indicados, en bajas cantidades y en mezcla con TNF, como vehículos para prolongar efectos beneficiosos de TNF.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y la TBP-II de la invención o sus sales, derivados funcionales, precursores o fracciones activas o mezclas de cualesquiera de las anteriores como ingrediente activo, en donde dichas fracciones tienen la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF sobre células y/o mantener su efecto beneficioso prolongado. Estas composiciones se pueden utilizar en cualquier proceso en que hay una sobreproducción de TNF endógeno, tal como en casos de choque séptico, caquexia, reacciones de injerto frente a receptor, enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, etc. El modo de administración puede ser vía cualquiera de los modos aceptados de administración para agentes similares y dependerá del proceso que se ha de tratar, por ejemplo, intravenosamente en caso de choque séptico o inyección local en caso de artritis reumatoide (por ejemplo, en la rodilla), o continuamente por infusión, etc. Las composiciones también se pueden utilizar en casos de intoxicación con TNF causada por administración exógena de cantidades excesivas (sobredosis) de TNF. Las composiciones pueden comprender también TNF, en cuyo caso liberarán TNF de una manera controlada durante un tiempo prolongado.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan para administración mezclando la proteína o sus derivados con vehículos, estabilizantes y excipientes fisiológicamente aceptables y se preparan en forma de dosificación, v.g., por liofilización en viales de dosis. La cantidad de compuesto activo que se ha de administrar dependerá de la ruta de administración, la enfermedad que se ha de tratar y el estado del paciente. La inyección local en caso de procesos inflamatorios o artritis reumatoide requerirá menos TBP-II sobre una base de peso corporal que la infusión intravenosa en caso de choque séptico.

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos no limitativos.

#### Ejemplo 1

Purificación de TBP-II



### 1.1 Preparación de concentrado de orina

Un volumen de 200 litros de orina procedentes de donantes varones sanos o mujeres postmenopáusicas sanas se sometió a microfiltración sobre una membrana Pellicon con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . El filtrado se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana Pellicon con un punto de corte de peso molecular de 10 kDa hasta un volumen final de 500 ml. El concentrado se dializó contra solución salina tamponada con fosfato que contenía benzamidina 1 mM y azida de sodio al 0,1%.

### 1.2 Purificación por afinidad de TBP-I y TBP-II en una columna de TNF inmovilizada

TNF- $\alpha$  recombinante se llevó a una concentración de 7,2 mg/ml, después se equilibró con PBS que contenía azida de sodio al 0,02% y se copuló a Affigel 10 (3,6 mg a perlas de 0,5 ml). Una muestra de 250 ml del concentrado de proteínas de orina de la etapa 1.1 se aplicó a una columna construida a partir de las perlas del TNF inmovilizado a un caudal de 0,2 - 0,3 ml/min a 4°C. Las proteínas no fijadas se separaron por lavado con PBS y después se eluyeron las proteínas fijadas aplicando una solución de ácido cítrico 25 mM, NaCl 100 mM y azida de sodio al 0,02%, a pH 2,5. La bioactividad específica (inhibición de toxicidad de TNF) de las proteínas eluidas fue aproximadamente 20.000 veces más alta que la de las proteínas de orina bruta. En el análisis de EGPA-DSS la mayoría de la proteína en el eluato se desplazó como una sola banda ancha con tamaño molecular aparente de aproximadamente  $30.000 \pm 2.000$ .

### 1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa

Se hizo un fraccionamiento adicional de las proteínas purificadas por afinidad de la etapa 1.2 por HPLC en fase inversa en una columna Aquapore RP300 (4,6 x 30 mm, Brownlee Labs), preequilibrada primero y lavada después con ácido trifluoroacético acuoso al 0,3% (TFA) (Tampón F) hasta que se obtuvo una línea basal estable por el sistema de detección de fluorescamina. Se aplicaron a la columna fracciones activas reunidas eluidas de la columna de TNF de afinidad de la etapa 1.2, la elución se efectuó a un caudal de 0,5 ml/minuto con gradientes lineales de acetonitrilo y Tampón F (0-20% durante 5 minutos, seguido de 20-50% durante 60 minutos y finalmente 50-80% durante 5 minutos) y después la columna se lavó durante 15 minutos con acetonitrilo al 80%. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se examinaron para determinar el contenido de proteína (—) y la actividad biológica (■), como se indica en la Figura 1 (--- representa elución con gradiente de acetonitrilo en Tampón F).

La actividad biológica se midió por el mismo ensayo biológico desarrollado para TBP-I. Este se basa en el efecto citotóxico de TNF sobre células sensibilizadas con cicloheximida (CHI) y su cuantificación por el método de absorción de rojo neutro, como se describe en Wallach, D. (1984) J. Immunol. 132:2464-2469. En la presente invención, se utiliza para detectar la actividad de TBP-II durante la purificación.

- Las muestras que se iban a ensayar para determinar la presencia de la proteína se diluyeron seriamente al doble, a 4°C, en DMEM y se les añadió un volumen igual del mismo medio conteniendo 40  $\mu\text{g/ml}$  de TNF-alfa y 400  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida (CHI). La concentración final de TNF- $\alpha$  en las células fue 5 U/ml y la de CHI fue 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- Se sembraron células A9 murinas en placas de microtítulo de fondo plano, de 96 pocillos, ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) con 100  $\mu\text{l}$  de DMEM-CS (DMEM conteniendo 5% de suero bovino fetal y 5% de suero bovino).
- Se aplicaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de las mezclas de proteína-TNF-alfa-CHI diluidas seriamente a cada pocillo y además las células se incubaron durante 14 horas.
- La viabilidad de las células se determinó por incubación con rojo neutro durante 2 horas, separando por lavado todo el exceso de tinte, extrayendo el rojo neutro que había sido captado por las células con mezcla de tampón citrato de Sorenson-etanol, y cuantificándolas colorimétricamente a 570 nm con un Autolector Microelisa.
- 1 U/ml de actividad inhibidora de TNF se definió como el factor de dilución que da una protección estadísticamente significativa contra muerte por TNF ( $p < 0,05$ ).

# ES 2 072 330 T3

Tabla I

*Purificación de TBP-I y TBP-II*

	Etapa de la purificación	Proteína	Actividad protectora		Actividad específica	Purificación
		mg	Unidades	%	unidades*/mg	veces
5	Proteínas brutas en la orina	9,400	117.200	100	12.400	
10	Purificación por afinidad					
	Flujo continuo	9,300	Debajo del nivel de detección			
15	Proteínas eluidas	0,36	98.600	84,2	273.800	22.000
	HPLC fase inversa					
	Total	0,217	31.200	26,6	143.400	11.600
	TBP-I	0,070	22.300	19,0	318.600	
20	TBP-II	0,147	8.900	7,6	60.700	

\* Una unidad de actividad protectora se definió como la cantidad de proteínas que se fijan a TNF en cuya presencia se duplicó el número de células que permanecían viables en las condiciones del ensayo para evaluar el efecto protector de las proteínas contra la citotoxicidad por TNF.

Como se muestra en la Figura 1, se encontró que las proteínas activas eluían de la columna de HPLC como dos picos proteicos característicos, en fracciones que correspondían a acetonitrilo al 27% aproximadamente (TBP-I) y acetonitrilo al 31% aproximadamente (TBP-II). Ambas proteínas tenían un efecto protector contra citotoxicidad por TNF, aunque la actividad específica de TBP-II era menor que la de TBP-I (Tabla I).

El efecto inhibitorio de TBP-II sobre la fijación de TNF radiomarcado a células se determinó como describieron Olsson, I. y col. (1989) Eur. J. Hematol. 42, págs. 270-275. Como con TBP-I, se observó que TBP-II disminuye la fijación de TNF- $\alpha$ -I<sup>125</sup> a las células sólo cuando TNF- $\alpha$ -I<sup>125</sup> y TBP-II se aplican juntos a las células y no cuando se aplica primero TBP-II a las células y después se separa antes de la aplicación de TNF- $\alpha$ . Esto indica que la interferencia con la fijación de TNF- $\alpha$  a las células no se debe a un efecto de TBP-II sobre las células, sino que más bien refleja alguna clase de interacción entre TBP-II y TNF- $\alpha$ .

Las actividades de fijación de TBP-I y TBP-II se examinaron en un ensayo en fase sólida con el uso de preparados radiomarcados de las proteínas. Se encontró que ambos se fijaban a TNF- $\alpha$  y esta fijación podía ser competida por TNF- $\alpha$  en exceso y, a una efectividad más baja, también por TNF- $\beta$ . No pudo ser competida, sin embargo, por otras varias citocinas examinadas (IL-1, IL-6, IFN-gamma, Tabla II).

50

55

60

Tabla II

*Fijación de TBP-I y TBP-II a TNF- $\alpha$  y el efecto de citocinas competitivas*

Proteínas aplicadas* para competir con la fijación de TBP	TBP-I-I <sup>125</sup>	TBP-II-I <sup>125</sup>
(CPM fijados)		
-	27.700(±2.000)	17.634(±1.230)
TNF- $\alpha$ hu	1.050(± 140)	2.400(± 174)
TNF- $\beta$ hu	21.000(± 850)	6.240(± 230)
IL-1 $\alpha$	28.100(± 460)	17.840(± 890)
IL-6	27.050(± 570)	18.570(±1.120)
IFN-gamma	28.050(±1.050)	18.470(1.430)
TBP-I	1.900(± 170)	2.240(± 160)
TBP-II	N.D.	2.005(± 150)

\* Todas las proteínas se aplicaron a una concentración de 10  $\mu$ g/ml

#### 1.4. EGPA-DSS

Con el fin de verificar el resultado de la purificación, se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS) de acuerdo con el método de Laemmli U.K. y col. (1970) Nature 227:680. En la Figura 2A, se indica el análisis en condiciones reductoras de la etapa de purificación por afinidad: calle 1 - proteínas de orina no fraccionadas; calle 2 - proteínas eluidas de la columna de TNF por el tampón de pH bajo. En la figura 2B, se muestra el análisis en condiciones reductoras de fracciones activas que eluyen de la HPLC en fase inversa. Se mezclaron muestras con 3 x tampón muestra concentrado que contenía DSS al 6% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 15% v/v y se cargaron en un gel de acrilamida al 12% (calles 1-4: TBP-I; Calles 5-9: TBP-II). Como referencia para peso molecular, se utilizó una mezcla de marcadores de peso molecular (lactalbúmina  $\alpha$  14,4 kDa, inhibidor de tripsina de soja 20,1 kDa, anhidrasa carbónica 30 kDa, ovalbúmina 43 kDa, seralbúmina bovina 67 kDa y fosforilasa b 94 kDa). Se hizo correr un blanco con tampón muestra en la calle 10. El gel se hizo correr a 160 volt y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con plata (Oakley, B.R. y col. Anal. Biochem. 105:361).

#### 1.5 Análisis de secuencia N-terminal

Muestras de la TBP-II sustancialmente purificada de la invención (1-5  $\mu$ g, 50-200 pmoles en cada caso) se aplicaron a discos de fibra de vidrio revestidos con biobrene, tratados preliminarmente. Los discos secados se sometieron a ciclos repetitivos de degradación de Edman en un microsecuenciador de proteínas en fase de líquido-gas, pulsado, automático (Modelo 475), conectado directamente a un analizador de aminoácidos PTH por HPLC (Modelo 120) y a una unidad de entrada y tratamiento de datos Modelo 900, (todo el equipo de Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). La secuencia suministrada por el ordenador se comparó con los datos de partida y se corrigió en los casos necesarios. Se realizaron al mismo tiempo tres análisis separados con el fin de confirmar los datos de la secuencia. El rendimiento inicial fue superior a 40%, lo que indica que la proteína principal de la preparación (la banda de 30 kDa) está relacionada con la secuencia resultante.

El análisis de secuencia N-terminal de la proteína de la fracción 27 (Fig. 1) dio la siguiente secuencia:

Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-

acompañada por cantidades más altas de una secuencia 3 aminoácidos más corta:

Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr...

y por cantidades incluso más altas de una secuencia que carecía de dos aminoácidos terminales:

Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr...

Por otro lado, en la fracción 28, la secuencia Val-Ala-Phe-Thr-Pro... fue la principal y, además, se podía discernir en cantidades más pequeñas la secuencia más corta Phe-Thr-Pro..., y en cantidades aún más pequeñas la secuencia Thr-Pro...

5

La secuencia menos truncada de la proteína obtenida a partir de diferentes lotes de TBP-II purificada fue la siguiente:

Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-  
10 Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys

Ejemplo 2

*Preparación de péptidos trópticos de TBP-II*

15

La TBP-II purificada (180  $\mu$ g) se redujo y alquiló como describieron Andrews, P.C. y Dixon, J.E. (1987) Anal. Biochem. 161, págs. 524-528. Después se aplicó de nuevo a una columna Aquapore RP300 (véase el Ejemplo 1.3) con el fin de separar residuos de los reactivos de reducción-alkilación. Después, la TBP-II purificada se fragmentó por digestión durante una noche con tripsina (relación sustrato/enzima de 20:1), a pH 8,0. Los péptidos obtenidos se purificaron por HPLC en fase inversa en una columna C-18  
20 SynChropak<sup>®</sup> RP-P. Las secuencias de seis péptidos comprendidos en las fracciones 44, 50, 53, 53', 60 y 84 se determinaron como en el Ejemplo 1.5 y se representan en la Figura 3.

Ejemplo 3

25

*Preparación de anticuerpos policlonales frente a TBP-II*

Para la inmunización de conejos, los animales primero se inyectaron subcutáneamente con 20  $\mu$ g de TBP-II como emulsión en coadyuvante completo de Freund. Tres semanas después se inyectaron de nuevo, intramuscularmente, como emulsión en coadyuvante incompleto de Freund y después dos veces de nuevo subcutáneamente como solución en PBS, a intervalos de una semana. Los conejos se sangraron 10 días después de la última inmunización.

Para la purificación de inmunoglobulinas a partir del suero de conejo, se añadió sulfato de amonio saturado a 10 ml de suero a una concentración final de 50% de saturación. Después de incubar durante una noche a 4°C, las inmunoglobulinas se precipitaron por centrifugación. El sedimento se lavó dos veces con sulfato de amonio al 50%, después se solubilizó en borato de sodio 10 mM/azida de sodio al 0,02% a pH 9. A continuación, la solución se dializó extensamente contra la solución de borato-azida. Después se aplicó por cromatografía sobre una columna Mono-Q de HPLC, de la que se eluyeron las proteínas con un gradiente de NaCl 0-500 mM en la solución anterior de borato-azida. Las inmunoglobulinas eluyeron a una concentración de sal de NaCl aproximadamente 70 mM.

El antisero frente a TBP-II suprimió la fijación de TNF-I<sup>125</sup> a células HeLa en aproximadamente 50% a una dilución de 1:6400. Se produjo antisero frente a TBP-I en conejos en las mismas condiciones y se examinó el grado de reactividad inmunológica cruzada de ambos antiseros por análisis de manchado Western. Se demostró que TBP-I y TBP-II son inmunológicamente distintos: cada antisero reconocía significativamente sólo aquella especie de TBP frente a la que se había producido.

De modo similar, al examinar la interacción de los antiseros y las proteínas en ELISA, el antisero contra TBP-I se encontró que reaccionaba con TBP-I a una dilución de hasta 1:25.000, pero no reaccionaba con TBP-II, ni siquiera a una dilución de 1:100. La Figura 4 muestra los resultados de ELISA para la fijación de antiseros contra TBP-I y TBP-II a las dos especies de TBP. La fijación de ( $\square$ ) antisero contra TBP-I a TBP-I, ( $\blacksquare$ ) antisero contra TBP-I a TBP-II, ( $\bullet$ ) antisero contra TBP-II a TBP-I y ( $\circ$ ) antisero contra TBP-II a TBP-II, se presenta en términos de la absorbancia del producto de color en el ensayo de peroxidasa de rábano picante. Las lecturas en un ensayo control en el que los anticuerpos se aplicaron a pocillos revestidos con BSA se restaron. (La fijación leve del antisero contra TBP-II a TBP-I, observada en la Fig. 2, se pudo verificar que se debía a contaminación del antisero con anticuerpos frente a TBP-I, en pequeñas cantidades, debido a la presencia de algo de TBP-I en la preparación de TBP-II utilizada para inmunización).

60

## Ejemplo 4

*Efectos de los anticuerpos policlonales sobre la fijación de TNF a células*

5 Los antisueros frente a TBP-I y TBP-II se diluyeron en solución salina equilibrada de Dulbecco (PBS<sup>+</sup>) que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,1% (PBS/BSA) y después ya fuera directamente o en experimentos de competición, después de incubar con una muestra de TBP, se aplicaron durante 2 h sobre las células tratadas de las líneas celulares HeLa, MCF7, K562 y U937. Después, las células se lavaron y ensayaron para determinar fijación de TNF.

10 La Figura 5 muestra la inhibición de la fijación de TNF radiomarcado a células U937, K562, HeLa y MCF7 con antisueros frente a TBP-I (○) y TBP-II (□). La fijación neta observada en ausencia de antisuero (100%) se dio en células U937 - 2500 cpm, en células K562 - 1500 cpm, en células HeLa - 2400 cpm y en células MCF7 - 1100 cpm. Los resultados demuestran que los antisueros frente a TBP-I y  
 15 TBP-II interfieren con la fijación de TNF a las células; afectando cada uno de ellos en grados diferentes a las células de líneas diferentes. El antisuero frente a TBP-I inhibe eficazmente la fijación de TNF a células HeLa y MCF7, pero no tiene ningún efecto sobre la fijación de TNF a células U937 y sólo escaso efecto sobre la fijación de TNF a K562. Por el contrario, el antisuero frente a TBP-II bloquea eficazmente la  
 20 fijación de TNF a las células K562 y U937, pero inhibe la fijación de TNF a las células HeLa y MCF7 sólo a altas concentraciones. Se pudo demostrar que el efecto del antisuero frente a TBP-II sobre las últimas células, por experimentos de competición, en que se añadieron TBP-I y TBP-II al suero, era debido a la presencia de anticuerpos frente a TBP-I contaminantes en este preparado de antisuero frente a TBP-II.

## Ejemplo 5

25 *Anticuerpos monoclonales frente a TBP-II**Producción de los anticuerpos monoclonales*

30 Ratones Balb/C hembras (8 semanas de edad) se inyectaron con 1  $\mu$ g de TBP-C<sub>7</sub>I purificada en una emulsión de coadyuvanteH<sub>15</sub> completo de Freund en las almohadillas de las patas traseras y, tres semanas más tarde, subcutáneamente en el dorso en coadyuvante incompleto de Freund. Las demás inyecciones se administraron a intervalos semanales, subcutáneamente en PBS. Las dosis de recuerdo finales se administraron 4 días (i.p.) y 3 días (i.v.) antes de la fusión con 9,0  $\mu$ g de TBP-I en PBS. La fusión se  
 35 efectuó utilizando células NSO/Mr y linfocitos preparados a partir de los linfocitos tanto de bazo tanto como locales de las patas traseras como parejas de fusión. Los hibridomas se seleccionaron en DMEM suplementado con HAT, suero equino al 15% y 2  $\mu$ g/ml de gentamicina. Los hibridomas que se halló que producían anticuerpos frente a TBP-I se subclonaron por el método de dilución limitativa y se inyectaron en ratones Balb/C que se habían cebado con pristano para la producción de ascitos. Se aislaron inmuno-  
 40 globulinas a partir de los ascitos por precipitación con sulfato de amonio (50% de saturación) y después se dializaron contra PBS que contenía azida al 0,02%. La pureza fue aproximadamente 60% como se estimó por análisis sobre EGPA-DSS y tinción con azul Coomassie. Los isotipos de los anticuerpos se definieron utilizando un estuche ELISA asequible en el mercado (Amersham, U.K.).

45 Se obtuvieron varios clones positivos para estudios adicionales y se caracterizaron. Algunos de los subclones aislados con su isotipo y fijación de TBP-II en RIA inverso se enumeran en la Tabla III.

50

55

60

# ES 2 072 330 T3

Tabla III

*Subclones que producen anticuerpos monoclonales frente a TBP-I*

Número del clon	Selección con iRIA [CPM]	Selección de subclón con iRIA [CPM]	Isotipo
13.11 .12 .13	31.800	31.000 31.500 31.100	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>
14.1 .6 .7	15.300	15.400 16.200 15.300	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>
20.2 .5 .6	12.800	14.200 14.300 14.800	IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub>
22.7 .8	20.400	20.000 19.300	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>
27.1 .3 .9	18.000	27.000 25.000 28.000	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>
32.4 .5 .6	11.315	10.900 10.700 11.200	IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub>
33.1 .3 .4	18.400	11.400 10.500 14.800	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>
36.1 .5 .6	27.500	26.600 24.900 24.900	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>
41.3 .7 .10	13.800	18.100 18.100 18.800	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>

# ES 2 072 330 T3

Tabla III (Cont.)

*Subclones que producen anticuerpos monoclonales frente a TBP-I*

Número del clon	Selección con iRIA [CPM]	Selección de subclón con iRIA [CPM]	Isotipo
67.1 .16 .17	16.800	10.900 10.800 10.900	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>
70.2 .3 .4	15.100	5.100 5.200 5.300	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>
77.2	15.300	11.800	IgG <sub>2b</sub>
78.9	25.300	21.400	IgG <sub>2a</sub>
82.1 .4 .10	17.600	25.900 25.700 26.400	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub> IgG <sub>1</sub>
86.2 .5 .11	8.800	12.200 12.600 12.800	IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>2b</sub>
19.6 .9		29.700 28.900	IgG <sub>2a</sub> IgG <sub>2a</sub>

Los hibridomas TBP-II 13-12 y TBP-II 70-2 se depositaron en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur (CNCM), 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 12 de marzo de 1990 y se les asignó el n° I-929 y el n° I-928, respectivamente.

### Ejemplo 6

*Radioinmunoensayo inverso (iRIA) para la detección de los anticuerpos monoclonales frente a TBP-II*

Se utilizó este ensayo para estimar el nivel de los anticuerpos anti-TBP en los sueros de ratones inmunizados y para ensayar la producción de los anticuerpos por hibridomas. Placas de microtítulo de 96 pocillos, de PVC (Dynatech 1-220-25) se revistieron durante 12 h a 4°C con inmunoglobulinas F(ab) anti-ratón de cabra, purificadas por afinidad, (Biomakor, Israel, 10 µg/ml en PBS que contenía NaN<sub>3</sub> al 0,02%), después se bloquearon durante 2 h a 37°C con BSA al 0,5% en PBS suplementado con Tween 20 (Sigma) al 0,05% y NaN<sub>3</sub> al 0,02% (tampón bloqueante) y se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y NaN<sub>3</sub> al 0,02% (tampón lavador). Muestras de suero, en diluciones seriadas, o muestras de medio de propagación de hibridomas (50 µl) se aplicaron a los pocillos durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron con tampón lavador y se aplicó TBP-I marcado con I<sup>125</sup> (10.000 cpm, en tampón bloqueante) a los pocillos. Después de una incubación adicional de 2 h a 37°C, las placas se lavaron y se determinó

en el contador-gamma la cantidad de marcador que se fijó a los pocillos individuales.

#### Ejemplo 7

##### 5 *El uso de los anticuerpos anti-TBP-II para cromatografía de afinidad*

Los anticuerpos frente a TBP-II se pueden utilizar para la purificación de TBP-II por cromatografía de afinidad, de acuerdo con el procedimiento siguiente. Los anticuerpos monoclonales para cromatografía de afinidad se eligieron ensayando su capacidad de fijación al antígeno radiomarcado en un radioinmuno-  
 10 ensayo en fase sólida. Ascitos de todos los hibridomas se purificaron por precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación seguida de diálisis extensiva contra PBS. Placas de 96 pocillos de PVC se revistieron con los Amo purificados y, después de bloquear las placas con PBS que contenía BSA al 0,5%, Tween 20 (Sigma) al 0,05% y  $\text{NaN}_3$  al 0,02%, los pocillos se incubaron con 50.000 cpm de TNF-I<sup>125</sup> durante 2 h a 37°C, después se lavaron y se cuantificó en el contador gamma la radiactividad que se  
 15 había fijado a cada pocillo. Los anticuerpos con la capacidad más alta de fijación se examinaron para determinar su eficacia en cromatografía de inmovinoafinidad.

Se utilizó poliacrilhidrazida-agarosa como resina para inmovilizar los anticuerpos. Las inmunoglobulinas semipurificadas se concentraron y copularon a la resina como especificaron Wilchek y Miron, *Methods in Enzymology* 34:72-76, 1979. En estos experimentos, se ensayaron tres anticuerpos monoclonales frente  
 20 a TBP-I, clones 16, 20 y 34. Se construyeron columnas de anticuerpo de 1 ml de lecho. Antes de su uso, todas las columnas se sometieron a 10 lavados con el tampón de elución, cada lavado seguido de neutralización con PBS. Después, las columnas se cargaron con 120 ml de proteínas de orina concentradas en PBS con  $\text{NaN}_3$  al 0,02%. El caudal de las columnas se ajustó a 0,2-0,3 ml por minuto. Después de la carga, las columnas se lavaron con 50 ml de PBS y después se eluyeron con una solución que contenía ácido cítrico 50 mM, pH 2,5, NaCl 100 mM y  $\text{NaN}_3$  al 0,02%. Se recogieron fracciones de 1 ml. Se tomaron muestras de las proteínas de orina aplicadas, de la última porción del lavado (1 ml) y de cada fracción de la elución (8 fracciones de 1 ml por columna) y se ensayaron para determinar la concentración de proteínas y su actividad en el ensayo biológico para TBP-II. De acuerdo con las mediciones de proteína  
 30 antes y después de la copulación de los anticuerpos a hidrazida-agarosa, las cantidades de inmunoglobulina fijadas a las columnas estaban en el intervalo de 7 a 10 mg/ml de agarosa. Todas las mediciones de proteína se hicieron de acuerdo con un método de micro-fluorescamina en comparación con una solución patrón que contenía 100  $\mu\text{g}$  de BSA/ml (Stein, S. y Moschera, J., *Methods Enzymol.* 79:7-16, 1981).

#### 35 Ejemplo 8

##### *Determinación de TBP-II utilizando anticuerpos anti-TBP-II*

Los niveles de TBP en los sueros de individuos sanos, pacientes con cáncer o lupus eritematoso sistematizado (LES) y de mujeres embarazadas a término se determinaron por un método ELISA empleando  
 40 un anticuerpo monoclonal frente a TBP-II para cubrir las placas. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra y después de una incubación de 2,5 h a 37°C, los pocillos se lavaron con una solución de PBS, Tween al 0,05% y azida sódica al 0,02% y seguidamente se añadió un anticuerpo policlonal anti-TBP-II de conejo durante 2,5 h a 37°C. Después, los pocillos se lavaron de nuevo (sin azida) y se añadió anticuerpo copulado con peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra durante 2 h. Después de esta incubación y de  
 45 lavar, se añadió un tampón ABTS y se leyó la densidad óptica (D.O.) 30 min. después a 600 nm.

Los niveles normales de TBP-II en suero humano de individuos sanos determinadas por el método ELISA son  $1,48 \pm 0,46$  ng/ml.

50 En los sueros de 46 pacientes con Lupus Eritematoso Sistematizado (LES), los niveles de TBP-I fueron  $4,04 \pm 3,75$  ng/ml, un valor altamente significativo comparado con los niveles normales ( $p < 0,001$ ). Como se muestra en la Fig. 6, 29 de los 46 pacientes con LES tenían un nivel de TBP-II más alto que la media  $\pm$  2DT de valores normales. Se encontró una correlación altamente significativa entre los niveles de TBP-II y el índice de actividad de la enfermedad, desarrollado por Symmonds, D.P.M. y col., *Quarterly J. of Med.* (1988), vol. 69, págs. 927-937;  $r = 0,62$ ,  $p < 0,01$ . Se encontró una correlación similar entre TBP-II y el marcador clásico de actividad de LES, los anticuerpos anti-ADN ( $r = 0,64$ ,  $p < 0,001$ ) y entre una manifestación clínica principal de actividad de LES, es decir, dolor de las articulaciones, y TBP-II ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,001$ ).

60 Estos resultados indican que TBP-II puede ser útil como un marcador sensible de actividad de enfermedad y un predictor de exacerbaciones en pacientes con LES y, de este modo, puede ser útil para



controlar la activación inmunológica relacionada con la actividad de enfermedad en estos pacientes así como en pacientes con otras enfermedades autoinmunes.

5 Por el método ELISA anterior, se examinaron los niveles de TBP-II en sueros de pacientes con diferentes tipos de cáncer. En 20 de 34 pacientes (58,8%) con diferentes tipos de cáncer, los niveles de TBP-II fueron superiores a la media normal  $\pm$  2DT. La diferencia entre la TBP-II de pacientes de cáncer ( $4,16 \pm 4,08$  ng/ml) y controles sanos ( $1,48 \pm 0,46$  ng/ml) fue estadísticamente muy significativa ( $p < 0,001$ ).

10 Estos resultados indican que TBP-II puede resultar que es un marcador útil y universal de diferentes tipos de cáncer y se puede aplicar en la detección precoz de esta enfermedad. Después de la resección del cáncer, la normalización de los niveles de TBP-II puede ser un marcador de cura de la enfermedad. Un incremento en TBP-II, después de la normalización inicial, puede ser un marcador universal precoz y sensible de recaída de la enfermedad.

15 Catorce mujeres embarazadas a término con eclampsia o pre-eclampsia tenían niveles de TBP-II más altos en cantidades estadísticamente significativas ( $2,91 \pm 0,96$  ng/ml) que 16 mujeres embarazadas normotensas ( $1,58 \pm 0,52$ ), como se determinó por el método ELISA ( $p < 0,001$ ).

#### Ejemplo 9

##### 20 *Asociaciones de TBP-II y TNF*

Con el fin de examinar la actividad de TBP-II para prolongar los efectos beneficiosos de TNF, se hicieron los siguientes experimentos:

25 Fibroblastos FS11 (pase 9) se cultivaron en micropocillos (placas de 96 pocillos) a una concentración inicial de 10.000 células/pocillo. Después de 24 h, se añadieron mezclas que comprendían una concentración constante de TNFr (5 ng/ml) y diferentes concentraciones de TBP-II (3 ng a 100 ng/ml) a los respectivos pocillos. A los pocillos control se añadieron medio, TNFr solamente, o concentraciones respectivas de TBP-II, sin TNF. Después de 7 días en cultivo, los líquidos sobrenadantes de las células se recogieron y congelaron inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación adicional de citotoxicidad residual por TNF y TBP-II residual. Después de separar los líquidos sobrenadantes, se añadió  $\text{H}^3$ -timidina a una placa de FS11 durante 8 h mientras que se añadió tinte rojo neutro a una placa "gemela".

35 Los resultados se muestran en la Fig. 7. La Fig. 7 (D) muestra que en presencia de 5 ng/ml de TNF y concentraciones crecientes de TBP-II, el crecimiento fibroblástico aumentó significativamente (como se determinó por la absorción de tinte rojo neutro) o por incorporación de  $\text{H}^3$ -timidina (F). El examen de los líquidos sobrenadantes de FS11 congelados para determinar la citotoxicidad residual por TNF en un ensayo biológico (línea celular A9 de ratón) indicó una citotoxicidad residual que es paralela al incremento en las concentraciones de TBP-II (E) y que sugiere prevención de la caída de TNF en el sistema, por TBP-II.

45 Para explorar mejor este fenómeno, se añadieron TNFr, TBP-II y los respectivos controles a fibroblastos FS11 cultivados durante 2 h o 2, 5, 7 y 9 días en diferentes placas. Después de esto, los sobrenadantes se separaron y examinaron inmediatamente para determinar citotoxicidad por TNF.

50 Como se muestra en la Fig. 8, en 2 h, de los 5 ng de TNFr añadidos en presencia de TBP-II, sólo 0,6 ng permanecieron biológicamente activos, siendo el resto fijado y neutralizado por TBP-II. Sin embargo, entre los días 2 y 9, mientras que el TNFr "solo" pierde su actividad biológica rápidamente, la citotoxicidad detectable del TNFr en presencia de TBP-II fue 10 veces mayor. De este modo, TBP-II neutralizó inicialmente la alta concentración de TNF, pero protegió al TNF biológicamente activo restante de una pérdida acelerada de su actividad biológica. Estos resultados indican que TBP-II fija TNF y evita su descomposición natural o pérdida de actividad, siendo así útil como un vehículo para prolongar los efectos beneficiosos de TNF.

#### 55 Ejemplo 10

##### *Representación de los epítopes de TBP-II por análisis de competición cruzada con anticuerpos monoclonales (Amo) frente a TBP-II*

60 Placas de microtítulo de 96 pocillos, de PVC, se revistieron, como se ha descrito anteriormente, con Amo purificados frente a TBP-II (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Después de lavar y bloquear, las muestras de TBP-II mar-

## ES 2 072 330 T3

5 cada con  $I^{125}$  (100.000 cpm por pocillo) que se habían incubado previamente durante 2 h, a  $37^{\circ}C$ , con el mismo o con otro anticuerpo monoclonal frente a TBP-II (a  $1 \mu g/ml$ ) se pusieron en los pocillos; las placas se incubaron durante una noche a  $4^{\circ}C$ , se lavaron y se determinó la radiactividad fijada a cada pocillo en el contador gamma. Los resultados se expresan como porcentaje de los valores control (fijación de TBP-II en ausencia de Amo competidores).

10 Los resultados se resumen en la Tabla IV. Los anticuerpos monoclonales están indicados por los números de los clones en la primera fila y en la columna izquierda. Los bajos valores porcentuales de fijación indican que los dos anticuerpos compiten entre sí por los epítopes sobre TBP-II, mientras que los valores más altos indican que se fijan a diferentes epítopes. Los anticuerpos no competitivos son adecuados para uso en ELISA doble sandwich, v.g., clones 13 y 70.

*Análisis de competición cruzada con anticuerpos monoclonales frente a TBP-II*

Anticuerpo compe- tidor	Anticuerpos en fase sólida							
	13	14	19	20	22	27	32	33
13	4	64	53	73	31	51	161	35
14	119	20	90	13	13	84	156	11
19	103	28	7	19	11	5	144	11
20	119	17	93	14	10	88	149	9
22	109	26	94	22	13	82	128	12
27	106	23	11	27	14	8	145	17
32	150	267	150	291	156	186	14	163
33	115	19	98	23	16	86	133	12
36	155	262	168	271	144	185	167	158
41	117	119	119	118	101	109	118	76
67	112	138	125	141	125	157	136	107
70	150	246	150	255	145	166	4	162
77	121	18	98	15	13	78	148	11
78	118	20	9	26	10	6	153	13
82	107	110	130	116	112	121	128	89
86	122	181	125	166	126	129	131	120
valor 100%	31582	3958	2057	5437	4947	17395	25923	3525

## ES 2 072 330 T3

*Análisis de competición cruzada con anticuerpos monoclonales frente a TBP-II (continuación)*

Anticuerpo competidor	Anticuerpos en fase sólida							
	36	41	67	70	77	78	82	86
13	177	72	131	128	77	102	50	101
14	132	173	134	113	14	70	89	179
19	144	133	179	123	18	5	85	126
20	135	170	137	135	16	70	101	181
22	115	164	136	114	17	68	98	167
27	152	133	196	136	24	8	82	125
32	139	200	205	18	294	143	103	226
33	118	156	120	114	24	78	90	155
36	12	169	223	135	265	158	93	150
41	93	9	179	107	106	111	8	9
67	138	213	30	117	120	127	106	236
70	166	217	204	6	232	132	107	234
77	145	184	142	132	18	66	103	184
78	157	137	183	131	19	6	94	172
82	90	8	162	102	121	113	8	7
86	86	18	253	109	152	125	20	17
valor 100%	6368	8042	4368	24113	5887	22222	11608	9703

REIVINDICACIONES

1. Una Proteína II (TBP-II) que se fija a Factor de Necrosis Tumoral (TNF) que tiene las siguientes características:

5

- (a) inhibe el efecto citotóxico de TNF y/o mantiene sus efectos beneficiosos prolongados;
- (b) contiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr;

10

o sus sales, derivados funcionales, precursores o fracciones activas o mezclas de los anteriores, teniendo dichas fracciones la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF sobre las células y/o mantener su efecto beneficioso prolongado.

15

2. La TBP-II de la reivindicación 1, en forma sustancialmente purificada.

3. La TBP-II de la reivindicación 1 o 2, que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa cuando la proteína sustancialmente purificada se analiza por EGPA-DSS en condiciones reductoras.

20

4. La TBP-II de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se mueve como un solo pico en cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en fase inversa.

5. La TBP-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF- $\alpha$  sobre células A9 murinas.

25

6. La TBP-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene la siguiente secuencia de amino-ácidos: Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys- o una de sus formas truncadas.

30

7. Un procedimiento para el aislamiento de Proteína TBP-II sustancialmente purificada, que comprende:

(a) recuperar la fracción de proteína bruta a partir de un concentrado dializado de orina humana;

35

(b) someter dicha fracción de proteína bruta de la etapa (a) a cromatografía de afinidad en una columna de TNF inmovilizado, para obtener fracciones activas purificadas de Proteínas que se fijan a TNF, definidas por su capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF;

40

(c) someter dichas fracciones activas purificadas de las Proteínas que se fijan a TNF de la etapa (b) a HPLC en fase inversa, para obtener fracciones activas, sustancialmente purificadas, de proteínas que se fijan a TNF, definidas por su capacidad para inhibir el efecto citotóxico de TNF; y

45

(d) recuperar la proteína TBP-II sustancialmente purificada de la etapa (c), teniendo dicha proteína un peso molecular de aproximadamente 30 kDa en EGPA-DSS en condiciones reductoras, que se mueve como un solo pico en la fracción correspondiente a acetonitrilo al 31% aproximadamente en HPLC en fase inversa y que tiene la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF.

8. La TBP-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, producida por el procedimiento de la reivindicación 7.

50

9. La TBP-II de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, en que la TBP-II es de origen humano.

10. La TBP-II de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 9, que es una proteína recombinante.

55

11. La TBP-II de la reivindicación 10, que se produce en un hospedador procariótico, preferiblemente en *E. coli*, o en un hospedador eucariótico, preferiblemente en una célula de mamífero.

12. Una molécula de ADN que comprende una secuencia nucleotídica codificante de la TBP-II de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11.

60

13. Un vehículo de expresión replicable, que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 12 y es capaz, en una célula hospedadora transformante, de expresar la TBP-II definida en una cualquiera

## ES 2 072 330 T3

de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11.

14. Una célula hospedadora seleccionada entre una célula procariótica y una célula eucariótica, transformada con el vehículo de expresión replicable de la reivindicación 13.

5

15. Un procedimiento para producir TBP-II recombinante, que comprende las etapas de

(a) cultivar una célula hospedadora transformada según la reivindicación 13 en un medio de cultivo adecuado; y

10

(b) aislar dicha Proteína TBP-II que se fija a TNF.

16. Una composición farmacéutica que comprende TBP-II y/o sus sales, derivados funcionales, precursores o fracciones activas o mezclas de cualesquiera de los anteriores según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11, como ingrediente activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, teniendo dichas fracciones la capacidad de inhibir el efecto citotóxico de TNF sobre las células y/o mantener su efecto beneficioso prolongado.

15

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, para uso en el antagonismo del efecto deletéreo de TNF en mamíferos, especialmente en el tratamiento de procesos en que se forma endógenamente o se administra exógenamente exceso de TNF .

20

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, para uso en el mantenimiento de los efectos beneficiosos prolongados de TNF en mamíferos, cuando se utiliza con TNF administrado exógenamente.

25

19. Un anticuerpo frente a TBP-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11, que reconoce específicamente dicha proteína.

20. El anticuerpo según la reivindicación 19, que se **caracteriza** además porque bloquea la fijación de TNF a células U937 y K562.

30

21. El anticuerpo según la reivindicación 19 o 20, **caracterizado** además porque no bloquea la fijación de TNF a células HeLa y MCF7.

35

22. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, que es un anticuerpo policlonal.

23. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, que es un anticuerpo monoclonal.

40

24. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 23, producido a partir de un hibridoma formado por fusión de células de mieloma con células de bazo y/o linfocitos de ratones previamente inmunizados con TBP-II.

25. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 24, producido a partir de hibridoma TBP-II 13-12 (CNCM I-929).

45

26. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 24, producido a partir de hibridoma TBP-II 70-2 (CNCM I-928).

50

27. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, o sus fragmentos F(ab) o sales, derivados funcionales o fracciones activas del anticuerpo o de sus fragmentos junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, para uso en el bloqueo de la fijación de TNF a, y la inhibición de su efecto sobre, las células.

55

29. La composición farmacéutica según la reivindicación 28, para uso en el tratamiento de procesos en que se han de antagonizar los efectos de TNF, ya sea formado endógenamente o administrado exógenamente.

60

30. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, para uso en la simulación de los efectos beneficiosos de TNF sobre las células.

31. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, para uso en la simulación del efecto citotóxico de TNF.

5 32. Un inmunoensayo in vitro para TBP-II en fluidos corporales, **caracterizado** por medir su interacción con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26.

10 33. La TBP-II según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11, para uso en ensayos de diagnóstico para medir los niveles de anticuerpos frente a TBP-II producidos endógenamente en sueros de pacientes ante diversas enfermedades, preferiblemente ante enfermedades autoinmunes.

34. Un método para la purificación de TBP-II humana utilizando un anticuerpo adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 15 (a) copular dicho anticuerpo a una resina adecuada para construir una columna de inmunoafinidad;  
(b) cargar una solución que contiene dicha proteína en dicha columna de inmunoafinidad;  
(c) separar por lavado las proteínas no fijadas, utilizando un tampón lavador adecuado;  
20 (d) eluir la TBP-II fijada utilizando un eluyente adecuado; y  
(e) recoger la fracción enriquecida de dicha TBP-II

25

30

35

40

45

50

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---

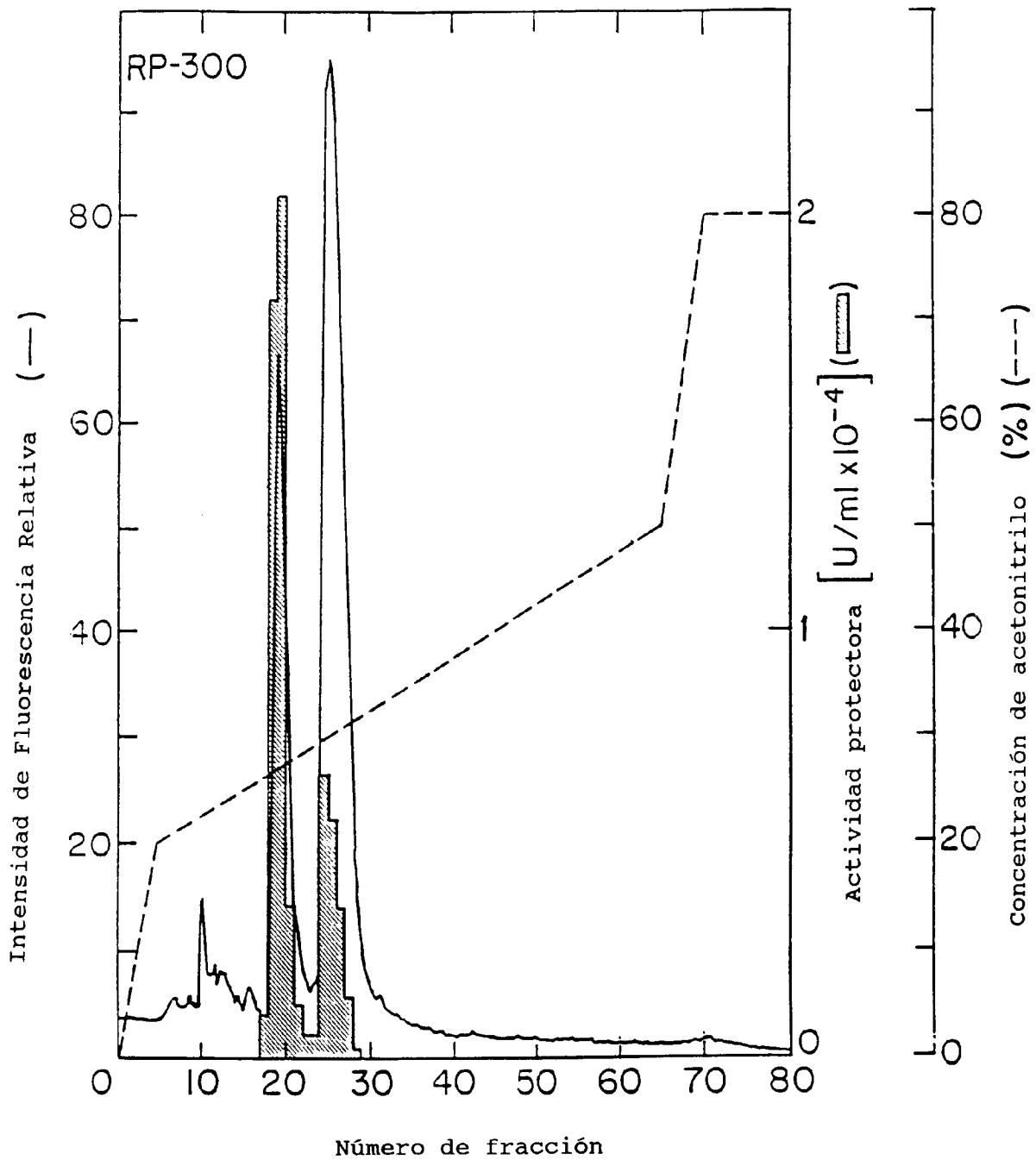


FIGURA 1

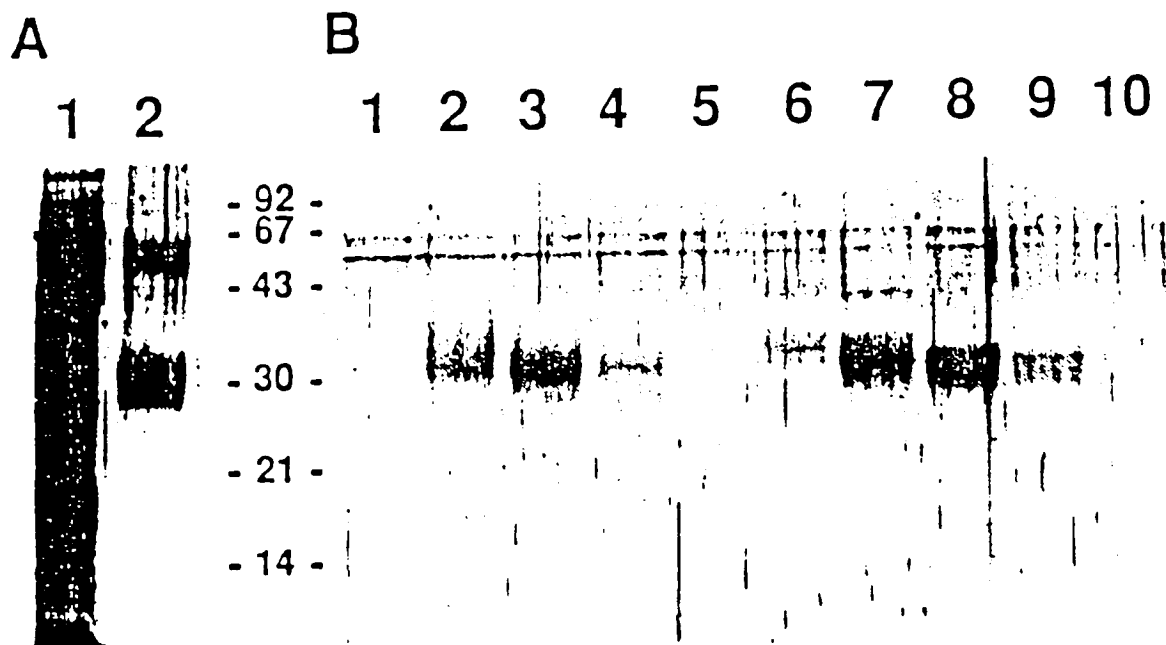


FIGURA 2



Secuencia de péptidos de TBP-II (digerido tróptico purificado en una columna C<sub>18</sub>)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
fracción 44 <sup>1</sup>	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys									
fracción 50 <sup>1</sup>	Leu	Arg	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys						
fracción 53 <sup>2</sup>	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg				
fracción 53 <sup>1</sup>	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg										
fracción 60	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Pro	Leu						
fracción 84:	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn

<sup>1</sup> Las secuencias del péptido en la fracción 44 solapa completamente con la secuencia del péptido en la fracción 50; ambas secuencias representan la extensión de la secuencia N-terminal descrita para la TBP-II intacta.

<sup>2</sup> La secuencia del péptido encontrado en la fracción 53 solapa completamente con la secuencia N-terminal descrita para la TBP-II intacta.

FIGURA 3

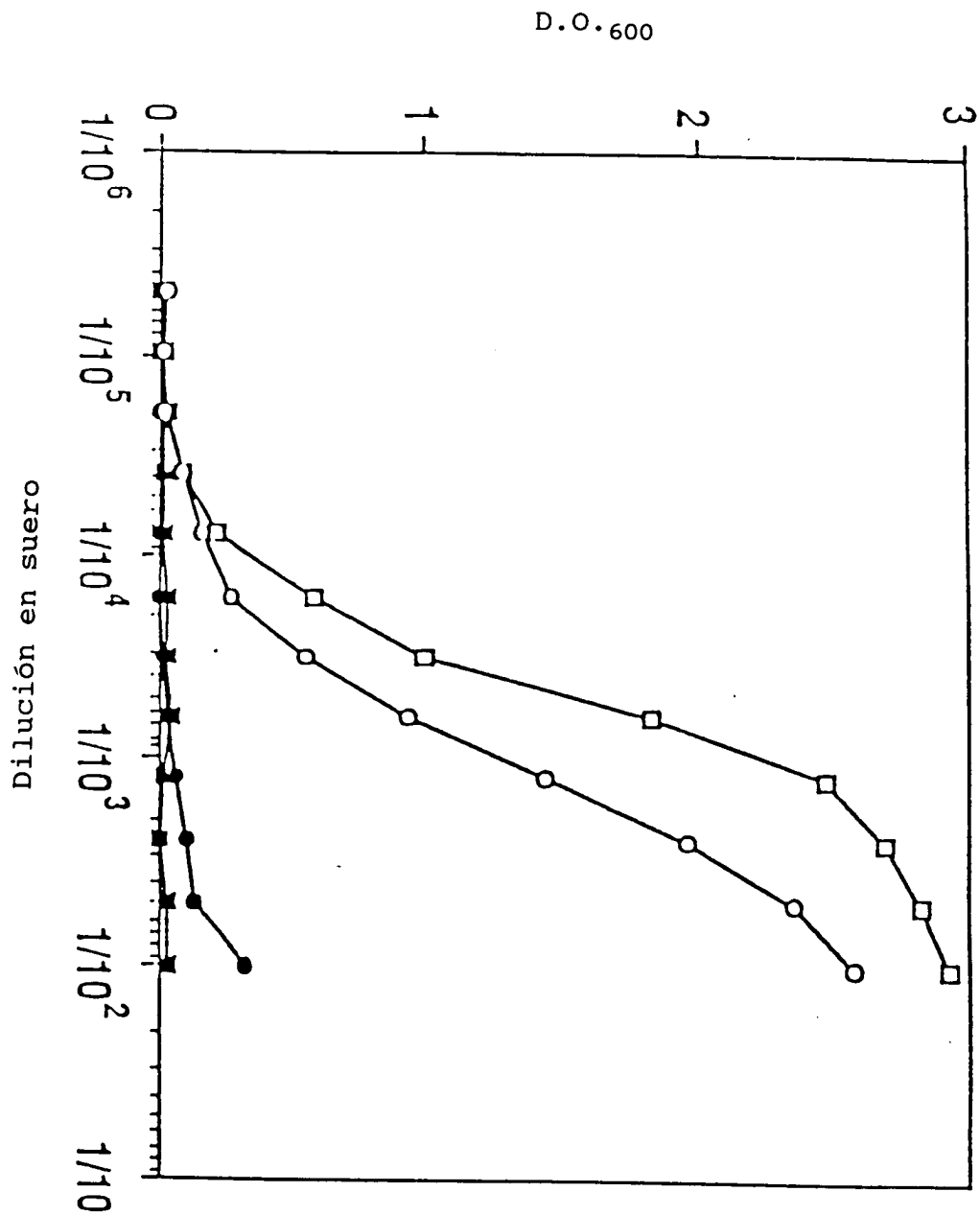


FIGURA 4

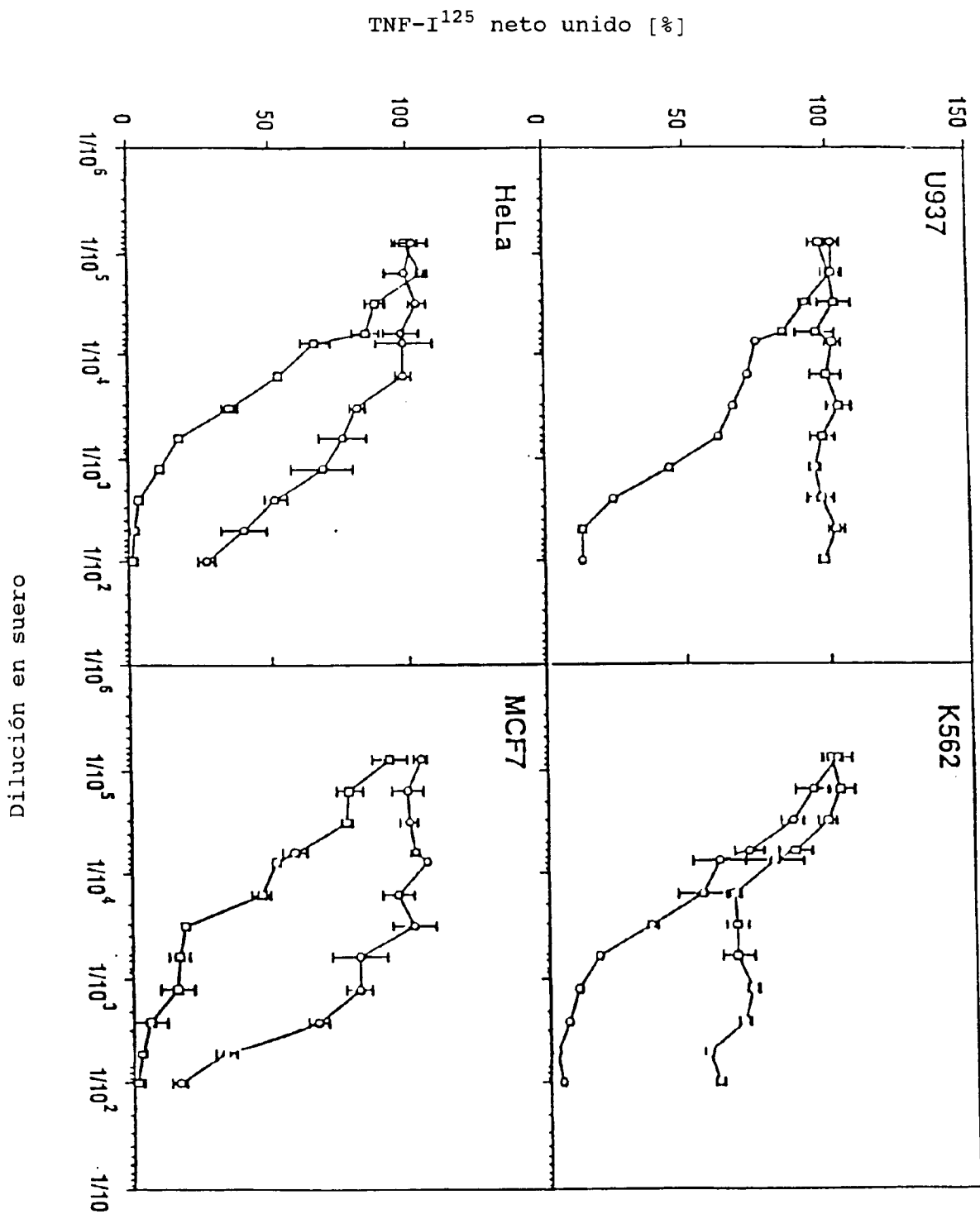


FIGURA 5

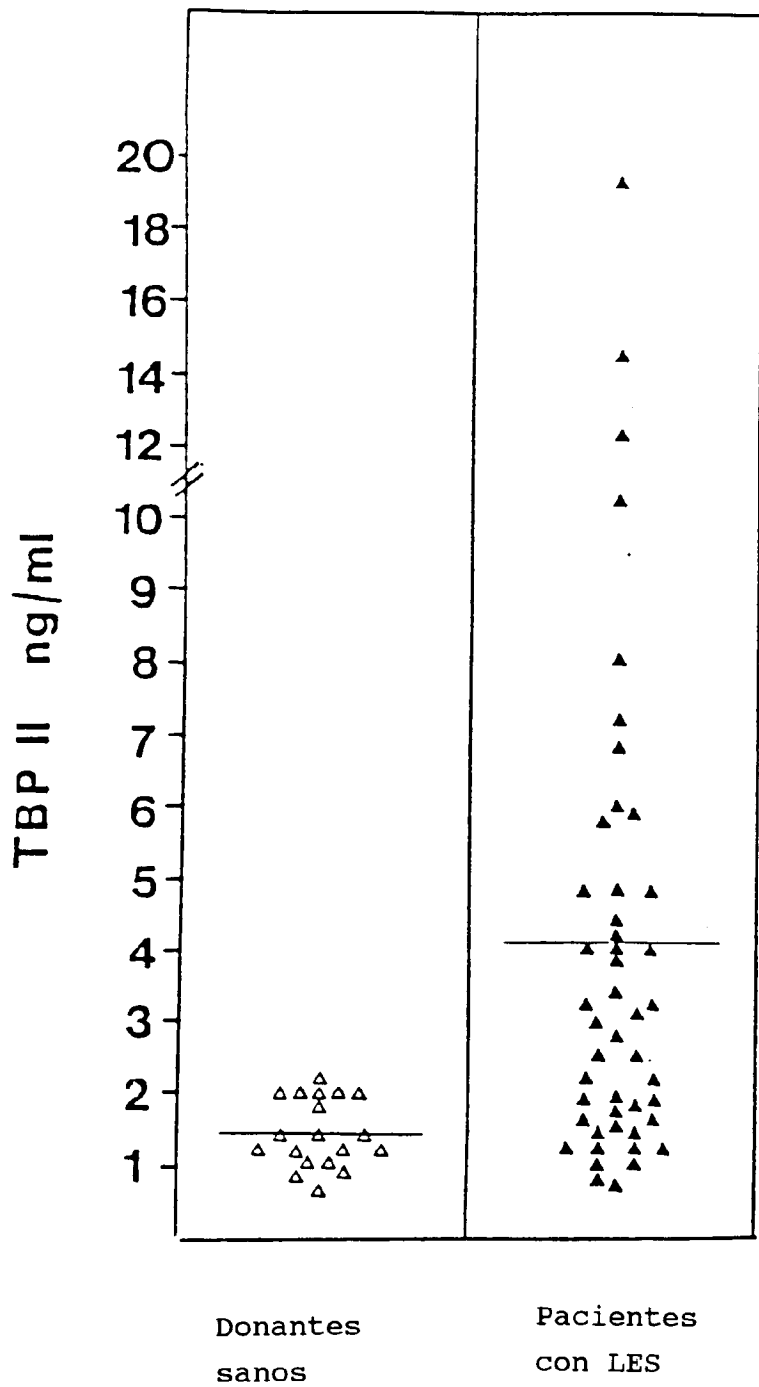


FIGURA 6

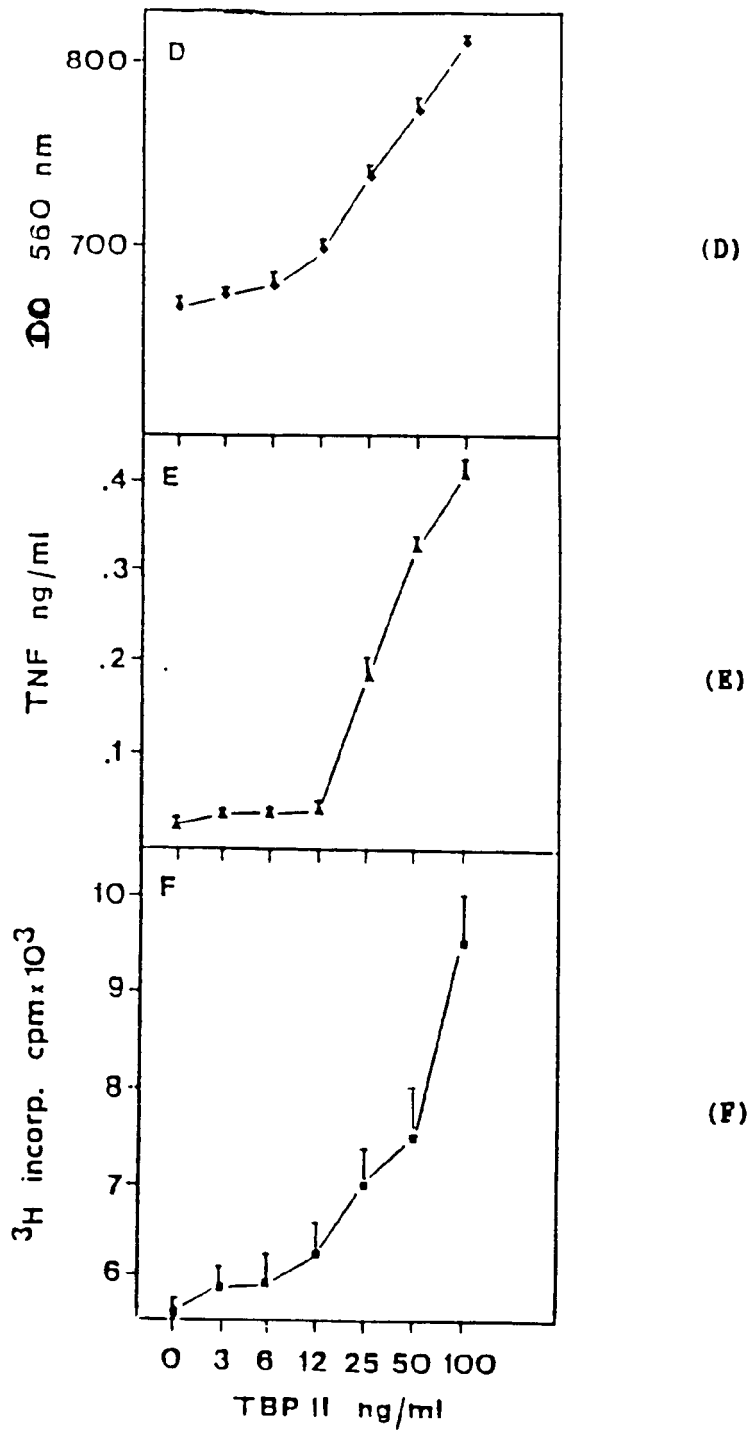


FIGURA 7

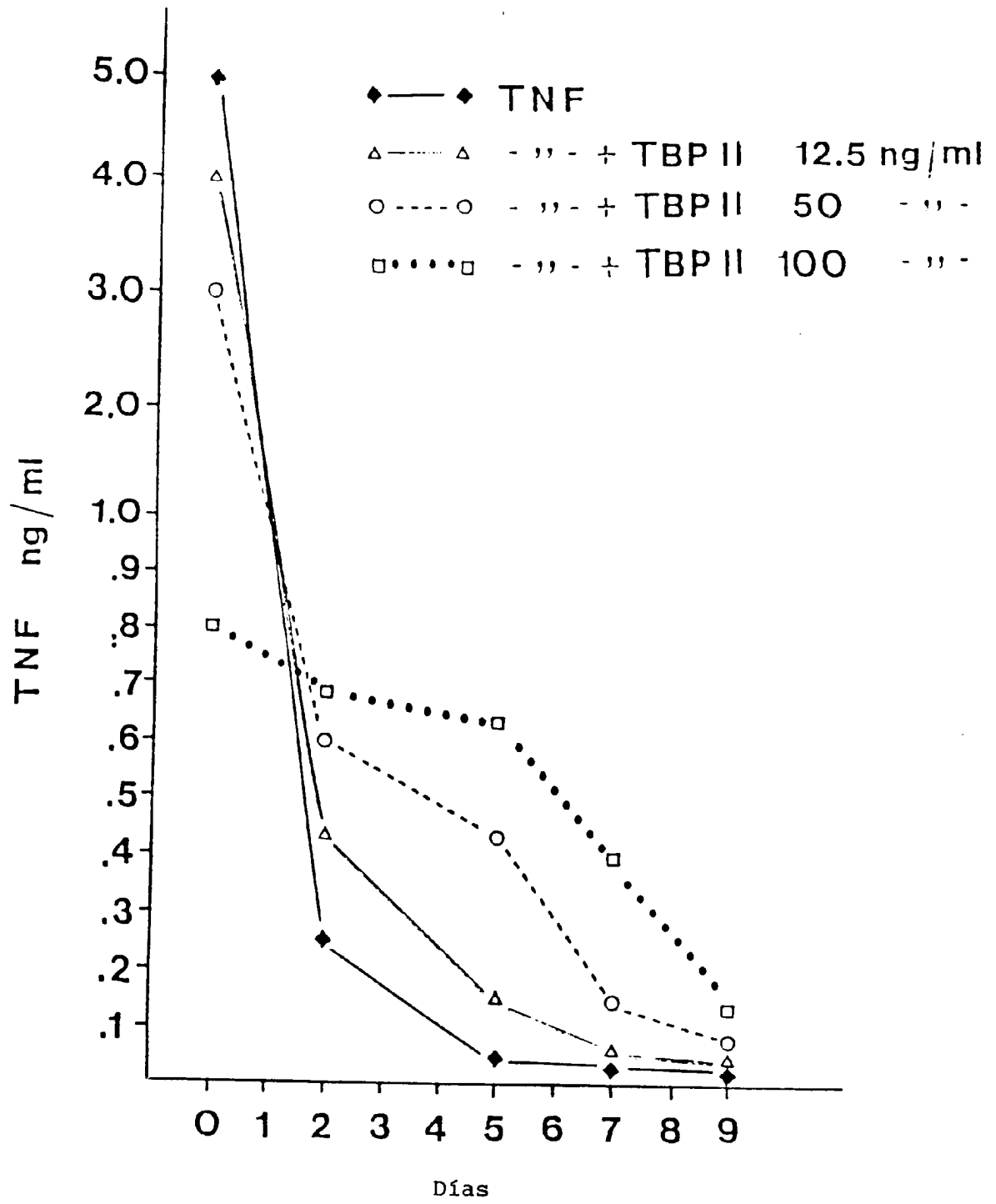


FIGURA 8