



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 712**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04770591 .8**

96 Fecha de presentación : **05.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1678209**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Anticuerpos contra NIK, su preparación y su uso.**

30 Prioridad: **07.10.2003 IL 158286**
28.07.2004 IL 163251

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

73 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science
P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL

72 Inventor/es: **Wallach, David y**
Ramakrishnan, Parameswaran

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 712 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra NIK, su preparación y su uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a moléculas inmunorreguladoras. Más en concreto, la presente invención se refiere a anticuerpos o a fragmentos de anticuerpos capaces de unirse de modo específico a la quinasa inductora de NF- κ B (NIK)/MAP3K14, o a una porción específica de ésta, y a su uso, por ejemplo para regular una actividad bioquímica de NIK y/o para permitir la detección de NIK o de una porción específica de ésta.

Antecedentes de la invención

10 No existe ningún tratamiento ni ningún tratamiento satisfactorio para numerosas enfermedades letales y/o muy debilitantes asociadas con una actividad desregulada de las moléculas de NF- κ B, incluyendo enfermedades malignas y enfermedades asociadas con respuestas inmunológicas patológicas, tales como enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con transplantes.

15 Las moléculas de la familia del NF- κ B son complejos de factores de la transcripción eucariotas críticos para la regulación de las respuestas inmunológicas, el crecimiento celular y la supervivencia (Ghosh, S. *et al.*, 1998, Annu. Rev. Immunol., 16:225-260) que son activadas de modo inducible por casi todos los miembros de la familia de receptores de TNF/NGF. Las moléculas de NF- κ B normalmente están secuestradas en el compartimento citoplásmico mediante la asociación física con una familia de inhibidores citoplásmicos ricos en anquirina denominados I κ B, que incluye I κ B α y proteínas relacionadas (Baldwin, A.S., Jr., 1996, Annu. Rev. Immunol., 14:649-683). En respuesta a diversos estímulos, incluyendo citoquinas, mitógenos y ciertos productos de genes víricos, el I κ B es fosforilado con rapidez en Ser32 y Ser36, y es ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteasoma 26S. Esto permite que el NF- κ B liberado se transloque al núcleo y participe en la transactivación de genes diana (Mercurio, F. y Manning, A.M., 1999, Curr. Opin. Cell Biol., 11:226-262; Pahl, H.L., 1999, Oncogene, 18:6853-6866). Recientes estudios de clonación molecular han identificado un complejo de quinasa de I κ B de múltiples subunidades (IKK) que media en la fosforilación inducida por señales de I κ B, un inhibidor de NF- κ B. El complejo IKK está compuesto por dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, IKK γ (NEMO). La actividad catalítica de IKK α e IKK β puede ser activada por una multitud de diferentes inductores de NF- κ B, incluyendo citoquinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina (IL)-1, el receptor de células T (TCR) y la proteína coestimuladora de células T, CD28 (Karin, M. y Ben-Neriah, Y., 2000, Annu. Rev. Immunol., 18:621-663).

30 La quinasa inductora de NF- κ B (NIK)/MAP3K14 (publicación WIPO nº WO 97/37016A1 de los presentes inventores) es crítica para la activación del NF- κ B. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de NIK conduce a una activación fuerte del NF- κ B (publicado en Wallach, D. *et al.*, 2002, Arthritis Res., 4, supl. 3:S189-196), y se ha demostrado que la expresión de mutantes de NIK catalíticamente inactivos conduce a la inhibición eficaz de la activación del NF- κ B en respuesta a una diversidad de activadores de NF- κ B conocidos, tales como LMP1, receptor de TNF (TNFR)-1, TNFR-2, RANK, receptor de Toll humano, CD3/CD28, receptor de IL-1 (IL-1R), proteína Tax del virus linfotrópico de células T humanas (HTLV)-1, y lipopolisacárido (LPS) (Malinin, N.L. *et al.*, 1997, Nature, 385:540-544; Sylla, B.S. *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:10106-10111; Damay, B.G. *et al.*, 1999, J. Biol. Chem., 274:7724-7731; Lin, X. *et al.*, 1999, Immunity, 10:271-280; Geleziunas, R. *et al.*, 1998, Mol. Cell. Biol., 18:5157-5165). La interrupción dirigida del gen NIK (Yin, L. *et al.*, 2001, Science, 291:2165-2165) y el estudio de la raza de ratones con "alinfoplasia" (aly) que portan una mutación puntual de sentido erróneo Gly885Arg natural en NIK (Shinkura, R. *et al.*, 1999, Nat. Genet., 22:74-77) reveló que la NIK desempeña un papel esencial en el desarrollo de órganos linfoides. Tanto ratones aly/aly como ratones con genes NIK inactivados manifiestan una ausencia sistémica de nodos linfáticos y placas de Peyer, arquitecturas esplénicas y tímicas desorganizadas, e inmunodeficiencia cuyas características más elásticas son unos bajos niveles de inmunoglobulinas séricas y una falta de rechazo a injertos (Shinkura, R. *et al.*, 1999, Nat. Genet., 22:74-77). Estas anomalías parecen reflejar una señalización aberrante por una diversidad de receptores. El desarrollo de deficiencias en los ratones NIK-mutantes se parece a lo que aparece en ratones deficientes en el receptor de LT- β (LT- β R), lo cual sugiere que NIK también participa en la señalización por este receptor concreto. Se ha podido demostrar que una capacidad proliferativa deteriorada de las células B en ratones aly/aly se correlaciona con una respuesta deficiente de estas células al LPS y al ligando CD40 (CD40L; Garceau, N. *et al.*, 2000, J. Exp. Med., 191:381-386), y la presencia de una cantidad excesiva de células B1 en la cavidad peritoneal de ratones puede atribuirse a defectos en el alojamiento de células peritoneales en el sistema de tejido linfático asociado al intestino (GALT) como consecuencia de una señalización deficiente de los receptores de quimioquinas en el tejido linfático secundario (Fagarasan, S. *et al.*, 2000, J. Exp. Med., 191:1477-1486).

55 Un papel importante y general para la NIK en la señalización de los receptores de citoquinas se ha demostrado en fecha reciente en estudios realizados por Wallach *et al.* que han demostrado, utilizando un sistema de dos híbridos, que la cadena γ del receptor de IL-2, o "cadena γ común", que es un componente señalizador de los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21, se asocia de modo específico con NIK (documento WO 03/087380). Se ha

descubierto que la sobreexpresión de la cadena γ común potencia la activación de NF- κ B mediada por NIK, y tras la estimulación con IL-2 o IL-15, se ha descubierto que la NIK y los componentes del signalosoma se unen a la cadena γ común. Por tanto, estos resultados indican la implicación de la NIK en la señalización a través de la amplia variedad de receptores de citoquinas que comprenden la cadena γ común como subunidad de señalización.

5 Aparte de estas y otras contribuciones a la regulación del desarrollo y la función del sistema inmunológico, la NIK también está implicada en la regulación de diversas funciones no inmunológicas. Los ratones *aly/aly* (pero no los ratones con genes NIK inactivados) muestran un desarrollo deficiente de las glándulas mamarias (Miyawaki, S. *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol., 24:429-434). Además, estudios *in vitro* han implicado a la NIK en la señalización que conduce a la diferenciación de células del músculo esquelético (Canicio, J. *et al.*, 2001, J. Biol. Chem., 276:20228-20233) y a la supervivencia y la diferenciación de neuronas (Foehr, E.D. *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275:34021-34024).

15 En coherencia con el papel sugerido de la NIK como mediador en la activación de NF- κ B, los fibroblastos derivados de ratones *aly/aly* y ratones con genes NIK inactivados no activan el NF- κ B en respuesta a la activación de LT- β R. Además, la sobreexpresión por LT- β R de VCAM-1, que se produce a través de la activación de NF- κ B, es anómala en fibroblastos embrionarios de ratón *aly/aly* (MEF; Matsumoto, M. *et al.*, 1999, J. Immunol., 163:1584-1591). También se ha advertido una fosforilación deficiente de I κ B en la respuesta de linfocitos B de *aly/aly* al acoplamiento de CD40. Por contraste, en células dendríticas de estos ratones, la fosforilación inducida por CD40 de I κ B es normal (Garceau, N. *et al.*, 2000, J. Exp. Med., 191:381-386). Las células peritoneales de *aly/aly* también son incapaces de responder a la quimioquina SLC con una mayor actividad NF- κ B (Fagarasan, S. *et al.*, 2000, J. Exp. Med., 191:1477-1486).

20 La evaluación del patrón de especies de NF- κ B expresadas en órganos linfoides de ratones *aly/aly* indica que, aparte de su papel en la regulación del complejo o de los complejos de NF- κ B formados por las proteínas Rel (A+p50) e I κ B, la NIK también participa en el control de la expresión/activación de otras especies de NF- κ B. De manera muy notable, los linfocitos de *aly/aly* son deficientes en p52, una especie de NF- κ B que se forma específicamente en linfocitos B maduros a través del procesamiento proteolítico de un precursor inactivo, p100 (NF- κ B2), lo cual sugiere una deficiencia en la conversión de p100 a p52 (Yamada, T. *et al.*, 2000, J. Immunol., 165:804-812). En efecto, se ha demostrado que la NIK participa en la fosforilación específica de sitio de p100. Ambos conducen directamente a la fosforilación de IKK α que, a su vez, fosforila a p100. Esta fosforilación actúa como desencadenante molecular para la ubiquitinación y el procesamiento activo de p100 para formar p52. Se ha descubierto que esta actividad de procesamiento de p100 desaparece con la mutación *aly* (Xiao, G. *et al.*, 2001, Mol. Cell, 7:401-409; Senftleben, U. *et al.*, 2001, Science, 293:1495-1499).

25 A la vista de la homología estructural de NIK con MAP3K, se han realizado algunos intentos de explorar la implicación de NIK en las cascadas de ERK, JNK y p38, las otras tres principales cascadas de proteína quinasas que implican a MAP3K (Akiba, H. *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., 273:13353-13358). Se ha demostrado que NIK está implicada en la cascada de ERK en células de feocromocitoma PC12 (Foehr, E.D. *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275:34021-34024). También se han presentado pruebas de que, en ciertas células, la NIK puede participar en la señalización para la fosforilación de Jun, la diana corriente debajo de la cascada de JNK, independientemente de esta cascada particular (Akiba, H. *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., 273:13353-13358; Natoli, G. *et al.*, 1997, J. Biol. Chem., 272:26079-26082). De modo global, estos descubrimientos indican que la NIK en efecto actúa como mediador de la activación de NF- κ B pero también puede tener otras funciones, y que ejerce estas funciones de una manera específica de células y de receptores.

35 De manera similar a otras MAP3K, la NIK puede ser activada como consecuencia de la fosforilación del "bucle de activación" dentro de la molécula de NIK. En efecto, la mutación de un sitio de fosforilación dentro de este bucle (Thr559) evita la activación de NF- κ B tras la sobreexpresión de NIK (Lin, X. *et al.*, 1999, Immunity, 10:271-280). Además, la actividad de NIK parece ser regulada a través de la capacidad de las regiones cadena arriba y cadena abajo de su motivo quinasa para unirse entre sí (Lin *et al.*, Molec. Cell Biol. (18), 10:5899-5907, 1998). La región C-terminal de NIK cadena abajo de su resto quinasa ha demostrado ser capaz de unirse directamente a IKK α (Regnier, C.H. *et al.*, 1997, Cell, 90:373-383), así como a p100 (Xiao, G. y Sun, S.C., 2000, J. Biol. Chem., 275:21081-21085) y a TRAF2 (Malinin, N.L. *et al.*, 1997, Nature, 385:540-544). Estas interacciones parece que son necesarias para la función de la NIK en la señalización del NF- κ B. La región N-terminal de la NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD) que está compuesto de un motivo básico (BR) y un motivo repetido rico en prolina (PRR) (Xiao, G. *et al.*, 2001, Mol. Cell, 7:401-409). Aparentemente, el NRD N-terminal interacciona con la región C-terminal de NIK en cis, inhibiendo con ello la unión de NIK a su sustrato (IKK α y p100). La NIK expresada ectópicamente parece formar de modo espontáneo oligómeros en los que estas uniones de las regiones N-terminales a C-terminales en cada molécula de NIK parecen estar interrumpidas, y muestra un nivel mayor de actividad constitutiva (Lin, X. *et al.*, 1999, Immunity, 10:271-280). Es muy probable que la unión de la región C-terminal de NIK a la proteína adaptadora asociada al receptor de TNF TRAF2, así como a otras TRAF (Malinin, N.L. *et al.*, 1997, Nature, 385:540-544; Rothe, M. *et al.*, 1994, Cell, 78:681-692; Takeuchi, M. *et al.*, 1996, J. Biol. Chem., 271:19935-19942) participe en la activación del NF- κ B por la NIK.

Se han presentado pruebas de que NIK, a través de la unión de su región C-terminal a IKK α , puede activar el complejo IKK. Se ha demostrado que es capaz de fosforilar la Ser176 en el bucle de activación de IKK α , y con ello activar esta molécula (Ling, L. *et al.*, 1998, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95:3792-3797). De forma coherente con dicho modo de acción, estudios sobre los mecanismos responsables de la deficiencia en la activación de NF- κ B por LT- β R en MEF de *aly/aly* han indicado que la mutación de NIK elimina la activación del signalosoma de IKK y la consiguiente fosforilación de I κ B (Matsushima, A. *et al.*, 2001, J. Exp. Med., 193:631-636). La capacidad de NIK para unirse a p100 directamente a través de su región C-terminal y fosforilarlo sugiere que p100 actúa como un sustrato directo de NIK (Xiao, G. y Sun, S.C., 2000, J. Biol. Chem., 375:21081-21085). No obstante, un estudio reciente sugiere que NIK media en la fosforilación de p100 de una manera indirecta, a través de la fosforilación y, por tanto, la activación de IKK α , que a su vez fosforila p100 (Senftleben, U. *et al.*, 2001, Science, 293:1495-1499).

Por tanto, la activación de las moléculas de NF- κ B por NIK representa un punto de control crítico para la regulación de la actividad NF- κ B.

Tal como se describió anteriormente, una actividad NF- κ B desregulada está asociada con la patogénesis de diversas enfermedades humanas importantes, tales como numerosas enfermedades malignas y enfermedades asociadas con respuestas inmunológicas patológicas (publicado en Yamamoto y Gaynor, 2001, J. Clin. Invest., 107:135-142). Por ejemplo, la activación de la vía de NF- κ B está muy implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como el asma, y la artritis reumatoide (Tak y Firestein, 2001, J. Clin. Invest., 107:7-11; Karin, M. y Ben-Neriah, Y., 2000, Annu. Rev. Immunol., 18:621-663), y la enfermedad del intestino inflamatoria. Además, una regulación alterada del NF- κ B parece estar implicada en la patogénesis de otras enfermedades, tales como la arteriosclerosis (Collins y Cybulsky, 2001, J. Clin. Invest., 107:255-264; Leonard, W.J. *et al.*, 1995, Immunol. Rev., 148:97-114) y la enfermedad de Alzheimer (Mattson y Camandola, 2001, J. Clin. Invest., 107:247-254; Lin, X. *et al.*, 1999, Immunity, 10:271-280), en las que la respuesta inflamatoria está al menos parcialmente implicada.

Varias líneas de pruebas indican que la activación por NF- κ B de genes de citoquinas es un contribuyente importante a la patogénesis del asma, que se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias y la desregulación de muchas citoquinas y quimioquinas en el pulmón (Ling, L. *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:3792-3797). Las citoquinas, tales como TNF, que activan el NF- κ B están en cantidades elevadas en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y contribuyen a los cambios inflamatorios crónicos y la hiperplasia sinovial que se observa en las articulaciones de estos pacientes (Malinin, N.L. *et al.*, 1997, Nature, 385:540-544). La administración de anticuerpos dirigidos contra TNF o un receptor de TNF truncado que se une a TNF mejora muchísimo los síntomas de pacientes con artritis reumatoide.

También se ha implicado el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por linfocitos y macrófagos en la patogénesis de enfermedades del intestino inflamatorias, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Matsumoto, M. *et al.*, 1999, J. Immunol., 163:1584-1591). La activación de NF- κ B se observa en especímenes de biopsias mucósicas de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activas. El tratamiento de pacientes que padecen enfermedades del intestino inflamatorias con esteroides disminuye la actividad NF- κ B en especímenes de biopsias y reduce los síntomas clínicos. Estos resultados indican que la estimulación de la vía del NF- κ B está implicada en la respuesta inflamatoria potenciada asociada con estas enfermedades.

La aterosclerosis es activada por numerosos ataques al endotelio y al músculo liso de la pared de vasos dañados (Matsushima *et al.*, 2001). Un gran número de factores del crecimiento, citoquinas y quimioquinas liberadas de las células endoteliales, el músculo liso, los macrófagos y los linfocitos están implicados en este proceso inflamatorio y fibroproliferativo crónico (Matsushima, A. *et al.*, 2001, J. Exp. Med., 193:631-636). La regulación por NF- κ B de genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el control de la proliferación celular ya se entiende que desempeña un papel importante en el inicio y el avance de la aterosclerosis.

Tal como se describió anteriormente, se ha demostrado que las anomalías en la regulación de la vía del NF- κ B están implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se ha encontrado una inmunorreactividad a NF- κ B de manera predominante y alrededor de los tipos de placas neuríticas tempranas en la enfermedad de Alzheimer, mientras los tipos de placas maduras muestran una actividad NF- κ B muy reducida (Mercurio, F. y Manning, A.M., 1999, Curr. Opin. Cell Biol., 11:226-232). Por tanto, la activación de NF- κ B se produce en el inicio de la formación de placas neuríticas y la apoptosis neuronal durante las fases tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, estos datos indican que la activación de la vía del NF- κ B desempeña un papel en una serie de enfermedades que tienen un componente inflamatorio implicado en su patogénesis.

Además del papel en la patogénesis de enfermedades asociadas con respuestas inmunológicas desreguladas, la hiperactivación o la activación constitutiva de la vía del NF- κ B también se ha implicado en la patogénesis de diversos cánceres humanos. Una activación anormalmente alta y/o constitutiva de la vía del NF- κ B se observa con frecuencia en una diversidad de malignidades humanas, incluyendo leucemias, linfomas y tumores sólidos (Miyawaki, S. *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol., 24:249-234). Estas anomalías producen unos niveles anormalmente altos y/o constitutivos altos de NF- κ B en el núcleo de una diversidad de tumores, incluyendo cánceres de mama, ovario, próstata y colon. La mayoría de estos cambios probablemente son debidos a alteraciones en las proteínas reguladoras que activan

las vías de señalización que conducen a la activación de la vía del NF- κ B. Sin embargo, las mutaciones que inactivan las proteínas I κ B, además de la amplificación y reordenación de genes que codifican miembros de la familia del NF- κ B, pueden producir los niveles nucleares aumentados de NF- κ B que se observan en algunos tumores (Emmerich *et al.*, Blood, 1 de noviembre, 94(9):3129-3134, 1999).

5 Puesto que, tal como se describió anteriormente, la NIK es crítica para la activación del NF- κ B, una estrategia potencialmente potente para regular la activación del NF- κ B y, por tanto, para tratar enfermedades asociadas con una actividad NF- κ B desregulada, implica identificar anticuerpos capaces de unirse de modo específico a NIK o a una porción específica de ésta y, con ello, prevenir o inhibir la activación del NF- κ B por la NIK.

10 Las estrategias de la técnica anterior no han podido proporcionar anticuerpos capaces de unirse a la NIK fosforilada en el aminoácido T559. Un anticuerpo de este tipo, que supuestamente era específico para la NIK fosforilada en T559, fue adquirido por los inventores el año pasado (2002) en Santa Cruz (SC12957R en Nacalai Tesque News [en línea], vol. 12, 2001). Sin embargo, el anticuerpo no funcionó de forma adecuada cuando los presentes inventores lo utilizaron y se unió también a un mutante de NIK que no puede fosforilarse en T559. Este año, Santa Cruz lo eliminó de su catálogo. El documento EP-A2 1.201.765 describe anticuerpos contra una quinasa diferente denominada quinasa que interacciona con Nck (NIK)/MAP4k4.

15 En la actualidad, un método para detectar diferentes especies molecular de NIK, que comprenden especies no fosforiladas y fosforiladas activas, emplea la sobreexpresión en células de la NIK marcada en el epitopo y un anticuerpo antimarcador. Este método de detección de la NIK fosforilada tiene muchas limitaciones; una de ellas es que el método no puede emplearse para detectar de modo específico NIK activada endógena.

20 Por tanto, se reconoce ampliamente la necesidad (y sería muy ventajoso su obtención) de anticuerpos capaces de unirse a la NIK fosforilada endógena.

Sumario de la invención

25 La invención se refiere a un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, humano o anti-antiidiotípico, o a sus fragmentos, que es capaz de unirse de modo específico a una secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5.

30 En una realización de la invención, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fv monocatenario, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, y una CDR, que es capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, tal como la que aparece en SEQ ID NO:6 y 3, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo IgG, policlonal o monoclonal, tales como los anticuerpos generados por el hibridoma NIK-P4 30.12, depositado en el CNCM como nº I-3095.

35 También se describe un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, humano o anti-antiidiotípico, o sus fragmentos, que es capaz de unirse de modo específico a NIK o a su muteína, su derivado funcional, su fracción activa, su derivado circularmente permutado o su sal, preparándose el anticuerpo inmunizando a un mamífero con una secuencia de aminoácidos, o una porción de la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, preferiblemente la porción de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

40 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo de la invención es capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK y/o de detectar de modo específico la NIK fosforilada, o una porción específica de ésta, por ejemplo mediante un análisis de inmunotransferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales generados por el hibridoma NIK-P4 30.12, depositado en el CNCM como nº I-3095.

45 La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, humano o anti-antiidiotípico, o sus fragmentos, que es capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5. Más en concreto, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que también es capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK, por ejemplo, inhibir la señalización de CD40 y/o CD70.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para regular una actividad bioquímica de NIK, comprendiendo dicho método poner en contacto la molécula de NIK con un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, humano o anti-antiidiotípico, o sus fragmentos, que es capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, en la que la secuencia de

aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, regulando con ello una actividad bioquímica de una molécula de NIK. Más en concreto, dicha puesta en contacto de la molécula de NIK con dicha preparación puede realizarse administrando dicha preparación a un individuo.

5 En una realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un sustrato, tal como una matriz de cromatografía de afinidad, unido covalentemente a un péptido con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, por ejemplo la SEQ ID NO:3, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559, para capturar de modo selectivo el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico al antígeno diana.

10 En otra realización, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad provocada o agravada por la actividad de NIK, que comprende la administración de un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5. o a una porción de ésta, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, a un individuo que lo necesite.

15 En otra realización, la invención se refiere a un método para la purificación de una proteína de unión a NIK, que comprende poner en contacto una muestra, tal como fluidos corporales, extractos celulares y bancos de expresión de ADN, conteniendo las muestras NIK y la proteína de unión a NIK, con un anticuerpo de la invención, coimmunoprecipitar la NIK y la proteína de unión a NIK, lavar el complejo inmunológico producido, y recuperar la proteína de unión a NIK del complejo inmunológico utilizando un péptido competidor derivado de NIK.

20 En otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para el desarrollo de un ensayo ELISA.

En otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo según la invención, para la inmunopurificación de NIK o de su muteína, su derivado funcional, su fracción activa, su derivado circularmente permutado o su sal.

25 Además, en una realización, la invención indica el uso de un anticuerpo o de un fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5, o a una porción de ésta, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad provocada o agravada por la actividad de NIK.

30 En una realización preferida de la invención, la enfermedad está asociada con respuestas inmunológicas patológicas, tales como una enfermedad autoinmunitaria, alérgica, inflamatoria y relacionada con trasplantes, y preferiblemente asma, artritis reumatoide, enfermedad del intestino inflamatoria, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer.

En otra realización preferida de la invención, la enfermedad es una enfermedad maligna.

35 Además, la invención indica el uso de un anticuerpo o de un fragmento de un anticuerpo de la invención en un método para identificar un ligando que es capaz de inducir la activación de NF- κ B mediada por NIK en una célula. En una realización de la invención, el método comprende la etapa de introducir el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo en una célula, incubar la célula con ligandos individuales, controlar la activación de NF- κ B y preferiblemente la activación de NF- κ B a través de la vía canónica, por ejemplo controlando la degradación de I κ Ba, y seleccionar el ligando que ha afectado a la activación de NF- κ B mediante el bloqueo específico de la NIK por el anticuerpo. En una realización preferida, la célula en el método para identificar el ligando es de tipo linfoblastoide, tal como células Ramos, BJAB y Jurkat.

40 Además, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende cultivar un hibridoma clonado que comprende una célula esplénica procedente de un mamífero inmunizado con una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO:6, o una porción de ésta, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, y una célula linfocítica homogénea o heterogénea en un medio líquido o abdomen de mamífero, para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.

La invención se define mediante las reivindicaciones.

50 Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en la presente, sólo como ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo referencia específica a los dibujos en detalle, se insiste en que los detalles que se muestran son sólo ejemplos y se ofrecen sólo para un análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y los aspectos

conceptuales de la invención. A este respecto, no se intentan mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, y la descripción junto con los dibujos hará evidente a los expertos en la técnica la manera en que varias formas de la invención pueden realizarse en la práctica. En los dibujos:

5 La figura 1 muestra un diagrama que representa los dominios NIK, T559, la región N-terminal, la región quinasa, y el dominio C-terminal de NIK (405-420), etc.

La figura 2 muestra una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos de la NIK humana (SEQ ID NO:5). El péptido derivado de NIK utilizado para la inmunización, SEQ ID NO:3, aparece subrayado.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos del bucle de activación de NIK (SEQ ID NO:4).

10 La figura 4 muestra una inmunoprecipitación (IP) con diferentes anticuerpos monoclonales preparados utilizando el péptido fosforilado según aparece en SEQ ID NO:3. Las células se transfectaron con pCS3MTNIK (WT-NIK), o con el vector que codifica la versión no fosforilada de la proteína, pCS3MTNIKT559A (NIK-). Las células transfectadas se recogieron y se lisaron en 2 ml de tampón NP-40 al 1%. Se emplearon 100 μ l de este lisado para cada IP. La IP se realizó con esferas de proteína G adsorbidas con los anticuerpos indicados. Se realizó una detección con transferencia Western y un control positivo para IP con el anticuerpo anti-myc.

15 La figura 5 muestra la unión diferencial del anticuerpo preparado con el péptido de SEQ ID NO:3 al péptido fosforilado derivado del bucle de activación mediante ELISA. El control y el péptido fosforilado derivado del péptido del bucle de activación (SEQ ID NO:3) se revistieron sobre placas de microvaloración a una concentración de 10 μ g/ml. Se añadió el sobrenadante del cultivo de hibridoma sin diluir del clon NK-P4 30.12 durante 1 hora a 37 °C. Se empleó anti-ratón HRP como anticuerpo secundario a una dilución 1:10K y se midió la DO 405 utilizando un sustrato ABTS.

20 La figura 6 muestra el efecto de NIK-P4 30.12 sobre la degradación de I κ B inducida por CD70, CD40 o TNF. Se transfectaron células Ramos con IgG (control negativo) o anticuerpo NIK-P4 30.12 (α -pNIK). Las células transfectadas no se trataron o se trataron con CD70, CD40 y TNF durante 20 min, 30 min y 20 min, respectivamente. Tras el tratamiento con el ligando, las células se lisaron y se sometieron a un análisis de inmunotransferencia Western sondado con un anticuerpo anti-I κ B.

25 La figura 7 muestra el efecto de NIK-P4 30.12 con respecto a un anticuerpo diferente generado contra un péptido de NIK localizado también en el dominio quinasa pero fuera del bucle de activación, sobre la degradación de I κ B inducida por CD40. Las células se transfectaron con IgG (control negativo), anticuerpo NIK-P4 30.12 (p4) o un anticuerpo diferente generado contra un péptido de NIK localizado también en el dominio quinasa pero fuera del bucle de activación (SEQ ID NO:7, 81). Las células transfectadas no se trataron (-cd40) o se trataron con CD40 (+cd40) durante 30 min. Tras el tratamiento con el ligando, las células se lisaron y se sometieron a un análisis de inmunotransferencia Western sondado con un anticuerpo anti-I κ B.

Descripción de las realizaciones preferidas

35 La presente invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a la quinasa inductora de NF- κ B (NIK)/MAP3K14 (SEQ ID NO:5) fosforilada en el resto T559, o a una porción específica de ésta, y a su uso. De modo específico, el anticuerpo de la presente invención puede utilizarse para regular una actividad bioquímica de NIK, y para detectar de modo específico la NIK fosforilada en el resto T559, o una porción específica de ésta. En virtud de permitir dicha regulación y dicha detección, el anticuerpo puede utilizarse, respectivamente, para regular la activación de NF- κ B y, por tanto, para tratar una enfermedad asociada con una actividad NF- κ B desregulada, y para caracterizar aspectos de procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos que implican a NIK, o a una porción específica de ésta.

40 No existe tratamiento ni un tratamiento satisfactorio para numerosas enfermedades letales y/o muy debilitantes asociadas con una actividad NF- κ B desregulada. Estas enfermedades incluyen enfermedades malignas y enfermedades asociadas con respuestas inmunológicas patológicas, tales como enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con trasplantes. Puesto que la NIK es un activador crítico del NF- κ B, una estrategia potencialmente potente para tratar una enfermedad asociada con una actividad NF- κ B desregulada implica identificar anticuerpos capaces de unirse de modo específico a la NIK fosforilada, o a una porción específica de ésta, y utilizar dichos anticuerpos para regular terapéuticamente la actividad NF- κ B. En virtud de permitir la detección específica de la NIK fosforilada, o de una porción específica de ésta, estos anticuerpos también permiten la caracterización de aspectos de procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos que implican a la NIK fosforilada, o a una porción específica de ésta.

45 Mientras se estaba llevando a la práctica la presente invención se generó de modo inesperado un anticuerpo que era capaz de unirse de modo específico o de unirse de modo específico óptimamente a NIK (SEQ ID NO:5) fosforilada en T559, o a una porción específica de ésta, tal como la porción que aparece en SEQ ID NO:3. La

capacidad del anticuerpo de la presente invención para unirse de modo específico a la NIK fosforilada en T559, o una porción de ésta, tal como la porción que aparece en SEQ ID NO:3, es exclusiva con relación a todos los anticuerpos de la técnica anterior.

5 Por tanto, por claro contraste con los anticuerpos de la técnica anterior, el anticuerpo de la presente invención puede utilizarse para regular óptimamente una actividad bioquímica, tal como una actividad quinasa de NIK, o de una porción específica de ésta, y para detectar óptimamente la NIK fosforilada en T559, o una porción específica de ésta. El anticuerpo de la invención también puede utilizarse para coimmunoprecipitar y aislar factores reguladores que se unen a la NIK fosforilada en T559.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que un anticuerpo, tal como el de la presente invención, puede tratarse utilizando métodos convencionales, por ejemplo como se describe en la presente a continuación, para generar uno o más tipos de fragmentos de anticuerpos que tengan características de unión al antígeno fundamentalmente idénticas a las del anticuerpo sin tratar.

15 Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a la NIK fosforilada en T559, o a una porción de ésta, tal como la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3.

La expresión “una porción de un péptido” se define como al menos un tripéptido dentro del bucle de activación, en el que uno de los aminoácidos es treonina fosforilada y los aminoácidos adyacentes al N-terminal y al C-terminal son glicina y ácido glutámico, respectivamente, es decir, GT(p)E.

20 Las porciones del bucle de activación fosforilado (SEQ ID NO:4) que tienen como penúltimo aminoácido la T599 fosforilada se denominan en la presente en lo sucesivo “antígeno diana”. La T599 es el resto treonina en la posición T599 en la proteína NIK completa (SEQ ID NO:5) y también es el resto treonina que se conserva en las porciones derivadas de ésta, por ejemplo, treonina en la posición 11 es SEQ ID NO:3, treonina en la posición 26 en SEQ ID NO:4, y treonina en la posición 26 en SEQ ID NO:6.

25 Tal como se describe en la presente a continuación, el anticuerpo puede utilizarse para regular óptimamente la actividad bioquímica de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK)/MAP3K14, tal como una actividad quinasa, y por tanto puede utilizarse para regular óptimamente la activación de NF- κ B, y por tanto puede utilizarse para tratar óptimamente una enfermedad asociada con la desregulación de la actividad NF- κ B. Además, el anticuerpo puede utilizarse, de modo exclusivo, para detectar la región del bucle de activación fosforilada de NIK, o de cualquiera de diversas porciones específicas de ésta, y puede utilizarse para detectar óptimamente cualquiera de diversas porciones específicas de la región del bucle de activación de NIK. Como tal, el anticuerpo puede utilizarse para caracterizar óptimamente aspectos de procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos que implican a la NIK fosforilada en T559, o a una porción específica de ésta.

35 Tal como se emplea en la presente, el término “tratar”, cuando se refiere a una enfermedad, indica prevenir de la aparición de una enfermedad, aliviar una enfermedad, atenuar o eliminar los síntomas de una enfermedad, frenar o revertir el avance de una enfermedad, o curar una enfermedad.

Tal como se emplea en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a una molécula de anticuerpo intacta o sustancialmente completa.

40 Tal como se emplea en la presente, la expresión “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula que comprende una porción de un anticuerpo capaz de unirse de modo específico a un antígeno, un determinante antigénico o un epitopo.

Tal como se describe en la sección de ejemplos que aparece a continuación, la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, 4 y 6 representa los restos aminoácidos 549-560, 534-566 y 534-560 de la NIK humana, respectivamente, y se localizan en el bucle de activación de la NIK humana.

45 Preferiblemente, el anticuerpo de la invención es capaz de unirse al antígeno diana con máxima afinidad. Los anticuerpos de la invención, por ejemplo, los anticuerpos que tienen capacidad de unión al antígeno diana según la invención, son capaces de detectar de modo específico y eficaz la NIK fosforilada en T559 mediante un análisis de inmunotransferencia Western.

Los anticuerpos de la invención, por ejemplo, los anticuerpos que tienen capacidad de unión al antígeno diana según la invención, son capaces de detectar de modo específico y eficaz la NIK fosforilada en T559 mediante ELISA.

50 Los anticuerpos de la invención, por ejemplo, los anticuerpos que tienen capacidad de unión al antígeno diana según la invención, son capaces de inmunoprecipitar de modo específico y eficaz la NIK fosforilada en T559.

En una realización específica, se generaron anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para la NIK fosforilada, utilizando el péptido inmunizante 549-560 (SEQ ID NO:3) con la secuencia de aminoácidos SLLTGDYIPGT(p)E, en la que T(p) es treonina fosforilada y está localizada en el penúltimo aminoácido de la

secuencia.

Además, pueden utilizarse otros péptidos derivados del bucle de activación con la secuencia de aminoácidos DFGHAVCLQPDGLGKSLLTGDYIPGT(p)E (SEQ ID NO:6), o una porción de ésta, como péptido inmunizante, con la condición de que la T599 fosforilada se encuentre localizada en el penúltimo aminoácido de la secuencia.

- 5 Como alternativa, una cisteína, una lisina o cualquier otro aminoácido puede unirse de modo químico al extremo N-terminal del péptido inmunizante.

10 La expresión “se une de modo específico” según la invención se refiere a anticuerpos que pueden unirse a la NIK fosforilada en T599 pero, por contraste, tienen baja capacidad de unión o no se unen a la NIK no fosforilada. La unión diferencial del anticuerpo de la invención puede ensayarse mediante diferentes ensayos, por ejemplo mediante ELISA, análisis de inmunotransferencia Western e inmunoprecipitación.

Para generar un anticuerpo monoclonal según la invención pueden utilizarse diferentes razas de ratones inmunizados, preferiblemente la raza SJL. Además pueden utilizarse diferentes órganos hematopoyéticos del ratón inmunizado para la fusión para generar el hibridoma, por ejemplo bazo y/o nodos linfáticos.

- 15 Los anticuerpos preparados según la invención son capaces de reconocer la proteína NIK completa, o sus fragmentos, en estado fosforilado.

En otra realización, se ha demostrado que los anticuerpos según la invención pueden inhibir la degradación de I κ B y la consiguiente activación de NF- κ B inducida por CD40 o CD70 pero no por el ligando TNF. Estos resultados demuestran que el anticuerpo de la invención puede inhibir de modo específico la activación de NF- κ B.

- 20 Por tanto, el anticuerpo según la invención puede utilizarse para la terapia en enfermedades en las que la señalización de CD70 y CD40 está implicada en la patogénesis de la enfermedad y/o en enfermedades en las que los ligandos de la familia de TNF/NGF inducen la activación de NF- κ B mediada por NIK mediante la vía canónica. Los parámetros indicativos de la vía canónica de activación son, por ejemplo, la degradación de I κ B, la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65.

- 25 A la vista de los descubrimientos experimentales, el anticuerpo de la invención puede utilizarse en un método para identificar un ligando capaz de inducir la activación de NF- κ B mediada por NIK en una célula. En una realización de la invención, dicho método comprende la etapa de introducir el anticuerpo, o un fragmento del anticuerpo según la invención, o una IgG irrelevante como control, en una célula, incubar la célula con ligandos individuales, controlar los parámetros indicadores de la activación de NF- κ B, preferiblemente controlando los parámetros indicadores de la activación de la vía canónica, tales como la degradación de I κ B, la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65, y seleccionar el ligando por el cual la activación de NF- κ B ha sido específicamente afectada mediante el bloqueo de la NIK por el anticuerpo o su fragmento.

La inhibición de la activación de NIK observada con el anticuerpo de la invención, por ejemplo, NIK-P4 30.12, no se produce con otros anticuerpos específicos para NIK capaces de unirse a los dominios en la quinasa que excluyen la región del bucle de activación de NIK.

- 35 En general, un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse al antígeno diana con máxima afinidad permitirá una infrarregulación óptima de una actividad bioquímica mediada o asociada con el antígeno diana. De manera similar, el presente anticuerpo capaz de unirse de modo específico al antígeno diana con máxima afinidad en general permitirá la detección del antígeno diana con una sensibilidad óptima.

- 40 En virtud de la capacidad descrita anteriormente del anticuerpo para unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención, en particular en virtud de la capacidad exclusiva del anticuerpo para unirse de modo específico al antígeno diana de la presente invención localizado en una región funcional de NIK, el anticuerpo puede utilizarse para infrarregular una actividad bioquímica de NIK. En particular, en virtud de la capacidad exclusiva descrita anteriormente del anticuerpo para unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención localizado en la región del bucle de activación de NIK, el anticuerpo puede utilizarse para infrarregular óptimamente la actividad de NIK. Se apreciará que, puesto que esta actividad quinasa es crucial para activar el factor nuclear NF- κ B, tal como se describió anteriormente, un anticuerpo de la presente invención capaz de infrarregular óptimamente dicha actividad quinasa puede utilizarse para infrarregular óptimamente la actividad de NF- κ B.

- 50 Las proteínas NF- κ B son una familia de proteínas que comparten un dominio de 300 aminoácidos, el “dominio de homología Rel”. El dominio de homología Rel media en la unión al ADN, la dimerización y el transporte nuclear de las proteínas NF- κ B. Además del dominio de homología Rel, algunos miembros de la familia de NF- κ B también contienen un dominio de transactivación (por ejemplo, c-Rel, RelB, y p65). Los miembros p50 y p52 de NF- κ B se producen tras la activación mediante lisis de los precursores inactivos p105 y p100, respectivamente. El p50 y p52c tienen propiedades de dimerización de unión al ADN pero no tienen dominios de transactivación fuertes. Es la generación diferencial de estas proteínas, su capacidad para heterodimerizar con diferentes miembros de la familia,

y la interacción de estas proteínas con diferentes componentes del aparato de transcripción lo que contribuye a los diversos efectos de activación de la vía de NF- κ B. La NIK no afecta a todas las especies de NF- κ B sino sólo a especies de NF- κ B específicas, por ejemplo, induce la degradación de p100 y la generación de p52c, en respuesta a inductores específicos, por ejemplo linfotoxinas. Por tanto, es probable que la modulación de la NIK, por ejemplo utilizando los anticuerpos de la invención, afecte a aspectos específicos de las implicaciones patológicas de la activación de NF- κ B. Esto es una ventaja puesto que la inhibición no específica general de NF- κ B es peligrosa, por ejemplo porque puede producir una apoptosis extensa en el hígado.

Tal como se emplea en la presente, el término "infrarregular", cuando se relaciona con una actividad bioquímica, se refiere a prevenir, reducir o inhibir dicha actividad bioquímica.

Cuando se emplea para inhibir una actividad bioquímica de NIK, el anticuerpo preferiblemente es capaz de unirse de modo específico con un número máximo de antígenos diana dentro de una porción de NIK asociada con dicha actividad bioquímica. En particular, cuando se emplea para inhibir la actividad quinasa de NIK, el anticuerpo es preferiblemente capaz de unirse de modo específico a un número máximo de antígenos diana localizados dentro de las secuencias de aminoácidos de la región del bucle de activación de NIK que aparecen en SEQ ID NO:3 y 4. Aunque un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico sólo a un antígeno diana localizado dentro de una región funcional de la NIK, tal como la región del bucle de activación, puede emplearse para inhibir de modo eficaz una función bioquímica de la NIK, tal como la actividad quinasa, asociada con dicha región funcional, un anticuerpo capaz de unirse de modo específico con un número máximo de antígenos diana localizados dentro de dicha región funcional infrarregulará de modo más eficaz la actividad quinasa, en virtud de interferir con un número máximo de epitopos funcionales dentro de la región funcional.

Como alternativa, para inhibir la actividad quinasa de la NIK, el anticuerpo puede ser capaz, de forma ventajosa, de unirse de modo específico a un número máximo de antígenos diana localizados dentro de las secuencias de aminoácidos que aparecen en SEQ ID NO:3, 4 y 6.

En virtud de la capacidad descrita anteriormente del anticuerpo para unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención, el anticuerpo puede utilizarse para detectar de modo específico una NIK fosforilada en T559 con sensibilidad óptima, con relación a los métodos de la técnica anterior, y puede utilizarse de forma exclusiva para detectar de modo específico una NIK fosforilada en T559 y/o un antígeno diana de la presente invención.

El anticuerpo puede utilizarse fundamentalmente para cualquier aplicación que se beneficie de un reactivo capaz de unirse al antígeno diana de la presente invención con afinidad óptima. Estas aplicaciones incluyen, por ejemplo, purificación de afinidad y, por tanto, la identificación y la caracterización de ligandos específicos de NIK.

Por tanto, el anticuerpo de la invención puede utilizarse para la inmunopurificación de NIK, o de una porción de ésta. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención puede utilizarse en la etapa de captura para la purificación de NIK, o de una porción de ésta.

Tal como se describe y se ilustra en la sección de ejemplos que aparece a continuación, un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico con un polipéptido fosforilado que comprende la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, 4, 5 y 6 puede utilizarse para detectar de modo específico, según las indicaciones que aparecen en la sección, las secuencias de aminoácidos de los péptidos y proteínas fosforiladas que aparecen en SEQ ID NO:3, 4, 5 y 6, respectivamente.

Preferiblemente, un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención se deriva de suero de animales inmunizados con dicho antígeno diana (denominado en lo sucesivo en la presente "antisuero"). Tal como se describe y se ilustra en la sección de ejemplos que aparece a continuación, puede generarse un antisuero de la presente invención capaz de unirse de modo específico a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3 inmunizando un mamífero con el antígeno diana según el protocolo indicado en la sección. A continuación se proporcionan en la presente otras indicaciones para generar la preparación mediante la inmunización de un mamífero.

A continuación se proporcionan indicaciones para obtener un polipéptido, tal como el antígeno diana.

Dependiendo de la aplicación y del propósito, la preparación puede emplearse de modo ventajoso en forma de un antisuero no purificado, o puede purificarse de diversas maneras antes de su uso. Por ejemplo, la preparación puede utilizarse en forma de: (i) una preparación purificada de un anticuerpo con un isotipo específico o un conjunto de isotipos; (ii) una preparación purificada de un anticuerpo o de un fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a péptidos fosforilados de modo específico con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, 4, 5 y/o 6; (iii) una preparación purificada de un anticuerpo o de un fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse con una afinidad deseada a un antígeno diana de la presente invención.

Una preparación de la presente invención en forma de un antisuero no purificado puede ser conveniente y satisfactoria para su uso en diversas aplicaciones. Por ejemplo, como se describe y se ilustra en la sección de ejemplos que aparece a continuación, un antisuero no purificado de la presente invención, en particular un antisuero

no purificado generado mediante una inmunización con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, puede utilizarse para detectar de modo eficaz una NIK fosforilada mediante un análisis ELISA. En general, para aplicaciones que se benefician de una preparación de la presente invención capaz de unirse a un antígeno diana de la presente invención con un intervalo de afinidades/especificidades, será ventajoso un anticuerpo no purificado de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención. Esta preparación no purificada a menudo puede ser adecuada para una aplicación dada, puesto que la heterogeneidad del anticuerpo policlonal o de una mezcla de fragmentos de anticuerpos contenidos en ella a menudo incluye uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen una afinidad/especificidad de unión adecuada para el antígeno diana.

Como alternativa, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo purificado de la presente invención puede emplearse de modo ventajoso en aplicaciones, tales como las que implican la administración del anticuerpo o del fragmento del anticuerpo a un individuo, y en las que sea deseable la detección del antígeno diana con una sensibilidad óptima.

Tal como se emplea en la presente, el término "individuo" se refiere a un ser humano.

Por ejemplo, una preparación de anticuerpos IgG de la presente invención puede purificarse de modo ventajoso a partir de un antisuero de la presente invención utilizando una purificación de afinidad de proteína G, preferiblemente a través de una inmunoprecipitación de proteína G. Tal como se describe y se ilustra en la sección de ejemplos que aparece a continuación, un antisuero de la presente invención derivado de un animal inmunizado con el péptido fosforilado con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3 y purificado mediante una inmunoprecipitación con proteína G según el protocolo indicado en la sección, puede utilizarse para detectar con una sensibilidad óptima, mediante un análisis de inmunotransferencia Western, una inmunoprecipitación y un ELISA, los polipéptidos fosforilados con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, 4, 5 y 6.

Un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse de modo específico al antígeno diana puede utilizarse de modo ventajoso para regular, con especificidad óptima, una actividad bioquímica de NIK asociada con el antígeno diana, y para detectar el antígeno diana con especificidad óptima. En particular, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, 4, 5 y 6 puede utilizarse de modo ventajoso para regular la actividad quinasa de NIK con especificidad óptima. En general, para aplicaciones que se benefician de una reproducibilidad, una estandarización o una precisión óptimas, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse de modo específico al antígeno diana será, en general, óptimo con relación a una preparación no purificada de la presente invención.

La purificación del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo capaz de unirse de modo específico al antígeno diana puede lograrse, por ejemplo, purificando una preparación de la presente invención, tal como un antisuero no purificado de la presente invención, mediante una cromatografía de afinidad utilizando un sustrato unido covalentemente al antígeno diana. Este antígeno diana unido al sustrato puede utilizarse, según la metodología convencional de la cromatografía de afinidad, para capturar de modo selectivo el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo capaz de unirse de modo específico al antígeno diana.

El sustrato es preferiblemente una matriz de cromatografía de afinidad. Una matriz de cromatografía de afinidad, siendo un sustrato optimizado para realizar una cromatografía de afinidad, puede emplearse de forma ventajosa para lograr una purificación de afinidad óptima.

Puede emplearse sustratos que tiene diversas características estructurales y químicas para realizar la purificación.

Preferiblemente, el sustrato comprende un carbohidrato o su derivado. Preferiblemente, el carbohidrato es agarosa, Sepharose o celulosa.

Preferiblemente, el sustrato es una esfera, una resina, o una superficie de plástico.

Normalmente se emplean sustratos, tales como esferas, resinas, o superficies de plástico que comprenden carbohidratos, tales como agarosa, Sepharose o celulosa, para practicar la cromatografía de afinidad en la técnica.

En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para practicar la cromatografía de afinidad, tal como la que emplea dichos sustrato (por ejemplo, se remite a Wilchek, M. y Chaiken, I., 2000, *Methods Mol. Biol.*, 147:1-6; Jack, G.W., *Immunoaffinity chromatography*, *Mol. Biotechnol.*, 1, 59-86; Narayanan, S.R., 1994, *Journal of Chromatography*, A 658:237-258; Nisnevitch, M. y Firer, M.A., 2001, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49:467-480; Janson, J.C. y Kristiansen, T. en: "Packings and Stationary Phases in Chromatography Techniques" (ed. Unger, K.K.), p. 747 (Marcel Dekker, Nueva York, 1990); Clonis, Y.D. en: "HPLC of Macromolecules: A Practical Approach", p. 157 (IRL Press, Oxford, 1989); Nilsson, J. *et al.*, 1997, *Protein Expr. Purif.*, 11:1-16).

Como alternativa, una preparación de la presente invención puede purificarse utilizando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como cromatografía de intercambio iónico, filtración,

electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

5 Un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico a un antígeno diana de la presente invención con una afinidad deseada puede utilizarse de modo ventajoso para lograr un nivel deseado de regulación de una actividad bioquímica de NIK asociada con el antígeno diana, y puede utilizarse de modo ventajoso para detectar el antígeno diana con una sensibilidad deseada. En particular, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico con afinidad máxima a un antígeno diana de la presente invención comprendido en la región de quinasa de la NIK puede utilizarse de modo ventajoso para infrarregular óptimamente la actividad quinasa de la NIK. De forma similar, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse de modo específico al antígeno diana con afinidad máxima puede utilizarse de modo ventajoso para detectar el antígeno diana con sensibilidad óptima.

15 La purificación del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo capaz de unirse al antígeno diana con una afinidad deseada a partir de una preparación de la presente invención, tal como un suero no purificado de la presente invención, puede lograrse, por ejemplo, mediante una purificación con una cromatografía de afinidad de un anticuerpo no purificado (o más preferiblemente purificado con proteína G) de la presente invención, utilizando el antígeno diana como ligando de afinidad, y mediante elución selectiva de un anticuerpo o de un fragmento de un anticuerpo unido a un sustrato bajo condiciones de rigurosidad controladas (por ejemplo, bajo condiciones de pH y/o concentración salina controladas). En particular, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención capaz de unirse al antígeno diana con afinidad máxima puede obtenerse de forma conveniente mediante elución bajo condiciones de rigurosidad máxima y eficaz (por ejemplo, bajo condiciones de pH mínimo o máximo y/o de concentración salina máxima eficaces). Generalmente, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo puede unirse a un antígeno cognado para él unido a un sustrato bajo condiciones de pH y concentración salina fisiológicas, y dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo generalmente puede eluirse del sustrato disminuyendo el pH hasta 2,5 o menor, o aumentando el pH hasta 11 o mayor.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que tiene una afinidad caracterizada por una constante de disociación de hasta 10^{-12} para un antígeno cognado puede obtenerse utilizando técnicas habituales.

30 Tal como se describió anteriormente en la presente, la preparación puede comprender de modo ventajoso un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo unido a cualquiera de diversos tipos de moléculas detectables.

Una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo unido a una molécula detectable puede utilizarse para detectar el antígeno diana unido de modo específico por el anticuerpo o por el fragmento de anticuerpo.

35 La preparación puede comprender un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo unido a cualquiera de numerosos tipos de moléculas detectables, dependiendo de la aplicación y del propósito.

Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y del propósito, la molécula detectable puede ser, de modo ventajoso, un fluoróforo, una enzima, una molécula que emite luz, o un radioisótopo.

Preferiblemente, la molécula detectable es una enzima.

40 Una enzima puede utilizarse de modo ventajoso para permitir la detección del antígeno diana mediante cualquiera de diversos métodos de detección basados en enzimas. Los ejemplos de dichos métodos incluyen un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; por ejemplo, para detectar el antígeno diana en una disolución), un ensayo quimioluminiscente ligado a enzimas (por ejemplo, para detectar el complejo en una mezcla de proteínas separadas de modo electroforético), y un ensayo histoquímico ligado a enzimas (por ejemplo, para detectar el complejo en un tejido fijado).

45 Tal como se describe y se ilustra en la sección de ejemplos que aparece a continuación, puede utilizarse una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo unido a una enzima para detectar de modo eficaz la NIK mediante un análisis de inmunotransferencia Western o un ELISA.

Pueden emplearse numerosos tipos de enzimas para detectar el antígeno diana, dependiendo de la aplicación y del propósito.

50 Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano (HPR), β -galactosidasa, y fosfatasa alcalina (AP).

55 En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para practicar los métodos de detección molecular basados en enzimas (por ejemplo, se remite a Khatkhatay, M.I. y Desai, M., 1999, J. Immunoassay, 20:151-183; Wisdom, G.B., 1994, Methods Mol. Biol., 32:433-440; Ishikawa, E. *et al.*, 1983, J. Immunoassay, 4:209-327; Oellerich, M., 1980, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18:197-208; Schurrs, A.H. y van Weemen, B.K., 1980, J.

Immunoassay, 1:22-249.

5 Una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo unido a un fluoróforo puede emplearse de modo ventajoso para detectar el antígeno diana mediante cualquiera de numerosos métodos de detección molecular basados en la fluorescencia. Dependiendo de la aplicación y del propósito, dichos métodos incluyen citometría de flujo activada de fluorescencia (FACS; por ejemplo, para caracterizar la expresión o la presentación del antígeno diana en una población celular suspendida), microscopía confocal de fluorescencia (por ejemplo, para detectar la molécula en un tejido o célula vivo o muerto en tres dimensiones), hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET; por ejemplo, para detectar una asociación intermolecular específica que implique al antígeno diana), histoquímica de fluorescencia (por ejemplo, para detectar la molécula en una muestra histológica fijada) y similares.

10 Pueden emplearse diversos tipos de fluoróforos, dependiendo de la aplicación y del propósito, para detectar el antígeno diana.

Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen fitoeritrina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy-cromo, rodamina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente azul (BFP), rojo Texas y similares.

15 En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones con respecto a la selección del fluoróforo, los métodos para unir fluoróforos a diversos tipos de moléculas, tales como un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención, y a métodos para utilizar dichos inmunocombinados fluorescentes para detectar moléculas (por ejemplo, se remite a Richard P. Haughland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5ª edición, Molecular Probes, Inc. (1994); patente de EEUU nº 6.037.137 de Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, Nueva York, N.Y. (1995); Kay, M. *et al.*, 1995, *Biochemistry*, 34:293; Stubbs *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35:937; Gakamsky, D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer", en "Receptors: A Practical Approach", 2ª ed., Stanford, C. y Horton, R. (eds.), Oxford University Press, Reino Unido (2001); patente de EEUU nº 6.350.466 de Targesome, Inc.).

25 Los ejemplos de moléculas emisoras de luz adecuadas incluyen luminol.

Los ejemplos de radioisótopos adecuados incluyen [125]yodo, [35]azufre, [3]hidrógeno, [32]fósforo, etc.

30 La molécula detectable puede estar unida al anticuerpo o al fragmento de un anticuerpo de diversas maneras, dependiendo de la aplicación y del propósito, y de la naturaleza de las moléculas implicadas. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para unir una molécula detectable a un anticuerpo o a un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, se remite a "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Ed. Harlow, David Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); también se remite a las extensas indicaciones proporcionadas por The American Chemical Society, por ejemplo en <http://www.chemistry.org/portal/Chemistry>). Los expertos en la técnica, tales como los químicos, poseen los conocimientos requeridos para practicar de modo adecuado dichas técnicas de síntesis química.

35 Por consiguiente, una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo unido a una molécula detectable puede utilizarse para detectar de modo eficaz y exclusivo el antígeno diana fundamentalmente en cualquier contexto.

Dependiendo de la aplicación y del propósito, la preparación puede ser, de modo ventajoso, una preparación de cualquiera de diversos tipos de fragmentos de anticuerpos.

40 El fragmento de anticuerpo es preferiblemente un Fv monocatenario (scFv), o más preferiblemente un Fab, Fab', F(ab')₂ o CDR.

45 Un fragmento de anticuerpo tiene la ventaja de ser más pequeño que el anticuerpo de origen del cual se deriva pero mantiene sustancialmente idéntica especificidad de unión al antígeno diana, o especificidad de unión y afinidad de unión, que el anticuerpo de origen. Por tanto, un fragmento de anticuerpo, en virtud de ser más pequeño que el anticuerpo de origen, en general tendrá por ello una mejor biodistribución y propiedades de difusión (por ejemplo, sistémicamente *in vivo*, o en tejidos aislados) que el anticuerpo de origen. Un fragmento de anticuerpo que carece sustancialmente de una región Fc, tal como un Fv monocatenario, un Fab', un Fab, un F(ab')₂ o una CDR, resulta ventajoso para aplicaciones que implican la exposición de la preparación a una molécula capaz de unirse de modo específico a dicha región Fc y en la que dicha unión no es deseable. Generalmente esto puede implicar una unión no deseada de una región Fc expuesta a un receptor Fc cognado, o un componente del complemento de unión a Fc (por ejemplo, el componente del complemento C1q, presente en el suero). Los receptores Fc se presentan sobre la superficie de numerosos tipos celulares inmunológicos, incluyendo APC profesionales, tales como células dendríticas; linfocitos B; y granulocitos, tales como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y células cebadas. Por tanto, la ausencia de una región Fc del fragmento del anticuerpo puede resultar particularmente ventajoso para evitar una activación no deseada de células inmunológicas mediada por Fc o una cascada del complemento mediada por un componente del complemento, en particular cuando se administra la

preparación *in vivo* a un individuo.

Un $F(ab')_2$ es un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción de unión al antígeno divalente de una molécula de un anticuerpo.

5 Una preparación de $F(ab')_2$ de la presente invención puede obtenerse de modo conveniente utilizando métodos convencionales de la técnica, tratando una preparación de anticuerpos de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima pepsina. El producto de $F(ab')_2$ resultante es una partícula 5S.

Un Fab o Fab' es un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción monovalente de unión al antígeno de un anticuerpo.

10 La CDR puede generarse por ejemplo como se describe en el documento EP0585939, o como describe Stranberg *et al.* (Protein Eng., enero de 2001, 14(1):67-74). La CDR según la invención puede ser una CDR modificada que tenga un efecto potenciado sobre la modulación de la NIK. Un ejemplo de métodos de modificación de péptidos activos se describe en Sawa *et al.*, 1999 (J. Med. Chem., 42, 3289-3299).

15 Una preparación de Fab' de la presente invención puede obtenerse de modo conveniente utilizando métodos convencionales en la técnica, tratando una preparación de anticuerpos de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima pepsina, seguido de la reducción del $F(ab')_2$ resultante. Esta reducción puede realizarse utilizando un agente reductor de tiol, y opcionalmente utilizando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la ruptura de los enlaces disulfuro. Este tratamiento genera dos fragmentos monovalentes Fab' 3,5S y fragmento Fc.

20 Una preparación de Fab puede obtenerse de modo conveniente utilizando métodos convencionales de la técnica, tratando una preparación de anticuerpos de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima papaína para producir la cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada compuesta de los dominios variable y C_{H1} .

25 En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para generar un fragmento de anticuerpo mediante el tratamiento enzimático de un anticuerpo (por ejemplo, se remite a Goldenberg, patentes de EEUU nº 4.036.945 y 4.331.647; Porter, R.R., 1959, Biochem. J., 73:119-126).

Un Fv monocatenario (también denominado en la técnica "scFv") es una molécula monocatenaria que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unidas a través de un conector polipeptídico adecuado.

30 Una preparación de $F(ab')_2$, Fab', Fab, o Fv monocatenario, o CDR de la presente invención puede obtenerse utilizando técnicas recombinantes.

Preferiblemente, se obtiene un fragmento de anticuerpo recombinante aislando ARNm de linfocitos B de animales inmunizados con el antígeno diana, generando ADNC a partir del ARNm mediante RT-PCR, y empleando el ADNC para construir un banco de presentación de fagos de fragmentos de anticuerpos. Los linfocitos B pueden aislarse de modo conveniente del bazo o, como alternativa, de la sangre, médula ósea o nodos linfáticos del animal inmunizado.

35 Los fagos recombinantes que presentan un fragmento de anticuerpo que posean una propiedad de unión al antígeno diana deseable pueden seleccionarse del banco mediante el enriquecimiento secuencial de fagos que tengan dicha propiedad de unión a partir de un gran exceso de clones que no se unen. Esta selección puede lograrse utilizando cualquiera de diversas técnicas, incluyendo inmunoadsorción sobre un antígeno diana inmovilizado; inmunoadsorción utilizando una elución específica; utilizando un antígeno biotinilado; purificación de afinidad en columnas; o inmunoadsorción directa sobre células. Tras la selección, los fagos que presentan fragmentos de anticuerpos no específicos pueden retirarse mediante un lavado, y los fagos unidos que portan scFv que presenta la propiedad de unión al antígeno diana deseada se eluyen y se amplifican mediante una infección en *E. coli*. Cuando se ha aislado un fago recombinante que presenta un fragmento de anticuerpo que tiene una propiedad de unión al antígeno diana deseada, puede recuperarse la secuencia polinucleotídica que codifica las regiones variables del fragmento de anticuerpo a partir del paquete de presentación de fagos y clonarse en un vector de expresión procariota o eucariota recombinante utilizando la metodología convencional (por ejemplo, se remite a "Current Protocols in Molecular Cloning", Ausubel *et al.* (eds.), Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York, N.Y. (1989); Sambrook *et al.*, infra y referencias asociadas). Este vector de expresión procariota puede utilizarse para producir el fragmento de anticuerpo recombinante purificado en *E. coli* (por ejemplo, se remite a Studier *et al.*, 1990, Methods in Enzymol., 185:60-89). Este vector de expresión eucariota puede utilizarse para transformar genéticamente una célula eucariota para la expresión del fragmento de anticuerpo recombinante.

40

45

50

En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para obtener y aprovechar un banco de presentación de fagos de fragmentos de anticuerpos procedente del ARNm de linfocitos B (por ejemplo, se remite a Hoogenboom *et al.*, 1998, Immunotechnology, 4:1-20; Kand *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4363; Barbas *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978; Garrard *et al.*, 1991, Biotechnology, 9:1373-1377;

55

- Hoogenboom *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19:4133-4137; Sharon *et al.*, 2000, *Combinational Chemistry and High Throughput Screening*, 3:185-196; patentes de EEUU nº 5.698.426, 5.658.727, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108; publicaciones PCT WO 92/01047, WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401; Brinkman *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, *Gene*, 187:9-18; y Burton *et al.*, 1994, *Advances in Immunology*, 57:191-280; Pluckthun, en: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moors (eds.), Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Hoogenboom *et al.*, 1998, *Immunotechnology*, 4:1-20).
- 5 Se apreciará que la metodología descrita anteriormente puede utilizarse para obtener una preparación de fragmentos de anticuerpos monoclonales de la presente invención que tenga fundamentalmente cualquier afinidad y/o especificidad de unión al antígeno diana deseadas. Esta preparación puede utilizarse en diversas aplicaciones que se beneficien de un reactivo capaz de unirse al antígeno diana con dichas características de unión al antígeno diana definidas.
- 15 La presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende cultivar un hibridoma clonado que comprende una célula esplénica procedente de un mamífero inmunizado con una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO:6, o una porción de ésta, por ejemplo la que aparece en SEQ ID NO:3, en la que la secuencia de aminoácidos, o una porción de ésta, comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, y una célula linfocítica homogénea o heterogénea en un medio líquido o abdomen de mamífero, para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.
- 20 Un ejemplo de hibridoma que puede utilizarse para la preparación de anticuerpos monoclonales es el clon de hibridoma NIK-P4 30.12, depositado en el CNM como nº I-3095.
- Puesto que un Fab' tiene una estructura fundamentalmente similar a un Fab, una preparación de la presente invención que comprende un Fab' puede emplearse fundamentalmente de manera intercambiable con otra que comprenda un Fab, en la que dichos Fab' y Fab comprenden fundamentalmente las mismas regiones variables de cadena pesada y ligera. Como normalmente será el caso, para aplicaciones que se beneficien de una preparación de la presente invención que comprenda un fragmento de anticuerpo capaz de unirse al antígeno diana con afinidad máxima, una preparación de F(ab')₂ de la presente invención puede ser mejor que una preparación de Fab, Fab' o scFv de la presente invención, debido a la unión divalente de un F(ab')₂ al antígeno diana con relación a la unión monovalente de dicho fragmento de anticuerpo monovalente.
- 25 Tal como se mencionó anteriormente en la presente, dependiendo de la aplicación y del propósito, la preparación de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos puede originarse a partir de cualquiera de diversas especies de mamífero.
- 30 Una preparación de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos de la presente invención que se origine de una especie deseada puede obtenerse a partir del suero del animal de dicha especie inmunizado con el antígeno diana.
- 35 Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpos se origina en ratones.
- Dicho anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente, y puede tener o no actividad reticulante. Los anticuerpos utilizados según la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, tales como anticuerpos producidos en conejos, o anticuerpo monoclonales.
- 40 Preferiblemente, la invención se refiere al uso de una preparación de anticuerpos seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, humanos o anti-antiidiotípicos, o sus fragmentos. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se origina en ratones.
- 45 La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizado, anticuerpos humanos, anticuerpos contra anticuerpos antiidiotípicos (anticuerpo anti-anti-Id) que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como sus fragmentos, proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como disociación enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes.
- 50 Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos de antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión al epitopo sustancialmente similares. Los mAb pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975).
- 55 Se dice que un anticuerpo monoclonal es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar de modo específico con la molécula para unirse con ella a la molécula al anticuerpo. El término "epitopo" se refiere a la porción de cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo, que también puede ser reconocida por dicho anticuerpo. Los epitopos o "determinantes antigénicos" normalmente consisten en agrupaciones de moléculas con superficie químicamente activa, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y tienen características estructurales

tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula que es capaz de ser unida por un anticuerpo, siendo capaz también dicho antígeno de inducir a un animal para que produzca un anticuerpo capaz de unirse a un epitopo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epitopo. La reacción específica mencionada anteriormente indica que el antígeno reaccionará, de una manera muy selectiva, con un epitopo sobre su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos (documento 4.376.110; Ausubel *et al.*, eds., Harlow y Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y. (1992-1996)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM.

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes exclusivos asociados en general con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, una raza de ratón) como fuente del mAb con el cual se está preparando el anti-Id.

El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id también puede utilizarse como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunológica en otro animal, produciendo el denominado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, que indujo el anti-Id. Por tanto, utilizando anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresen anticuerpos con idéntica especificidad.

Por consiguiente, los mAb generados contra fragmentos de NIK pueden utilizarse para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Las células esplénicas procedentes de dichos ratones inmunizados se emplean para producir hibridomas anti-Id que segregan mAb anti-Id. Además, los mAb anti-Id pueden acoplarse a un vehículo, tal como hemocianina de lapa (KLH) y emplearse para inmunizar otros ratones BALB/c. El suero de estos ratones contendrá anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión del mAb original específico para un epitopo o fragmento de NIK.

Por tanto, los mAb anti-Id tienen sus propios epitopos idiotípicos, o "idiotopos", estructuralmente similares al epitopo que se está evaluando.

Una preparación de la presente invención de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humano o humanizado puede ser preferible para aplicaciones que impliquen la administración de la preparación a un individuo. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo humano o humanizado en general tiende a ser óptimamente tolerado inmunológicamente y, por tanto, mostrará una semivida óptima *in vivo* en un ser humano y, con ello, mostrará una eficacia óptima. A continuación se proporcionan más indicaciones con respecto a la producción y el aprovechamiento de anticuerpos humanos o humanizados.

Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención pueden emplearse para detectar de modo cuantitativo o cualitativo la NIK o su muteína, su derivado funcional, su fracción activa, su derivado circularmente permutado, su sal, o una porción de éstos, en una muestra, o para detectar la presencia de células que expresan la NIK o su muteína, su derivado funcional, su fracción activa, su derivado circularmente permutado, su sal, o una porción de éstos. Esto puede lograrse con técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado de modo fluorescente junto con microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o detección fluorométrica.

Los anticuerpos (o sus fragmentos) de la presente invención pueden emplearse de modo histológico, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de NIK, o de porciones de ésta, de la presente invención. La detección *in situ* puede realizarse retirando un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando el anticuerpo marcado de la presente invención a dicho espécimen. El anticuerpo (o un fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o revistiendo el anticuerpo marcado (o un fragmento) sobre una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento es posible determinar no sólo la presencia de NIK, o de porciones de ésta, sino también su distribución sobre el tejido estudiado. Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán con facilidad que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) puede ser modificado para lograr dicha detección *in situ*.

La muestra biológica puede acoplarse a un vehículo o soporte en fase sólida, tal como nitrocelulosa u otro vehículo o soporte sólido, que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El vehículo o soporte entonces puede lavarse con tampones adecuados, seguido de un tratamiento con un anticuerpo marcado según la presente invención, como se indicó anteriormente. El vehículo o soporte en fase sólida puede entonces lavarse con el tampón por segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido a dicho vehículo o soporte sólido puede entonces detectarse por medios convencionales.

Un “soporte en fase sólida”, “vehículo en fase sólida”, “soporte sólido”, “vehículo sólido”, “soporte” o “vehículo” es cualquier soporte o vehículo capaz de unirse a antígenos o a anticuerpos. Los soportes o vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble para los objetivos de la presente invención. El material de soporte puede tener casi cualquier configuración estructural posible, con la condición de que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Por tanto, la configuración del soporte o del vehículo puede ser esférica, tal como una esfera, cilíndrica, tal como la superficie interna de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, una tira de ensayo, etc. Los soportes o vehículos preferidos incluyen esferas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o serán capaces de determinarlos utilizando la experimentación habitual.

La actividad de unión de un conjunto dado de anticuerpos de la invención, tal como se indicó anteriormente, puede determinarse según métodos muy conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones operativas y de ensayo óptimas para cada determinación utilizando la experimentación habitual.

Pueden añadirse otras etapas, tales como lavado, remoción, agitación, filtración y similares, a los ensayos como resulta habitual o sea necesario para la situación concreta.

Una de las maneras en que un anticuerpo según la presente invención puede marcarse es uniéndolo a una enzima y emplearlo en un inmunoensayo enzimático (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando después se expone a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal manera que produce un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden utilizarse para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa. La detección puede realizarse mediante métodos colorimétricos que empleen un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede realizarse mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato por comparación con patrones preparados de forma similar.

La detección puede realizarse utilizando cualquiera de una diversidad de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, marcando de forma radiactiva los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos es posible detectar la R-PTPasa utilizando un radioinmunoensayo (RIA). Puede encontrarse una buena descripción de RIA en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, de Work, T.S. *et al.*, North Holland Publishing Company, NY (1978), haciendo referencia concreta al capítulo titulado “An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques”, de Chard, T.

El isótopo radiactivo puede detectarse por medios, tales como el uso de un contador-g o un contador de centelleo o mediante una autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo según la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado de modo fluorescente se expone a la luz de una longitud de onda apropiada, su presencia entonces puede detectarse debido a la fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes que se emplean más habitualmente está el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la alofococianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.

El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable utilizando metales emisores de fluorescencia, tales como ¹⁵²E u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales, tales como ácido dietilentriaminapentaacético (ETPA).

El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado de modo quimioluminiscente entonces se determina detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el desarrollo de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

De forma similar, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos, en la que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para los objetivos del marcaje son la luciferina, la luciferasa y la aequorina.

Una preparación de anticuerpos de la presente invención puede adaptarse para su utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como ensayo de “dos sitios” o “sandwich”. En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de un anticuerpo (o un fragmento de un anticuerpo) no marcado se une a un vehículo o soporte sólido, y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado de forma detectable para permitir la detección y/o la cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo de la fase sólida, el antígeno y el anticuerpo

marcado.

5 De forma típica y preferida, los ensayos inmunométricos incluyen ensayos “directos” en los que el anticuerpo unido a la fase sólida primero se pone en contacto con la muestra que se está ensayando para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo de antígeno-anticuerpo binario en fase sólida. Después de un periodo de incubación apropiado, el vehículo o soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra fluida, incluyendo el antígeno sin reaccionar, si hay, y después se pone en contacto con la disolución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que actúa como “molécula indicadora”). Después de un segundo periodo de incubación para permitir que el anticuerpo marcado forme un complejo con el antígeno unido al vehículo o soporte sólido a través del anticuerpo sin marcar, el vehículo o soporte sólido se lava por segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado sin reaccionar.

10 En otro tipo de ensayo de “sandwich”, que también puede ser útil con los antígenos de la presente invención, se utilizan los denominados ensayos “simultáneos” e “inversos”. Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación, puesto que el anticuerpo unido al vehículo o soporte sólido y el anticuerpo marcado se añaden ambos a la muestra que se está ensayando al mismo tiempo. Después de completar la incubación, el vehículo o soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra fluida y el anticuerpo marcado que no ha formado complejo. Entonces se determina la presencia del anticuerpo marcado asociado con el vehículo o soporte sólido, tal como se haría en un ensayo de sandwich “directo” convencional.

15 En el ensayo “inverso”, se utiliza la adición discontinua, primero de una disolución del anticuerpo marcado a la muestra fluida, seguido de la adición del anticuerpo no marcado unido a un vehículo o soporte sólido después de un periodo de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, la fase sólida se lava de una manera convencional para eliminar el residuo de la muestra que se está ensayando y la disolución de anticuerpo marcado sin reaccionar. Entonces se determina el anticuerpo marcado asociado con un vehículo o soporte sólido como en los ensayos “simultáneo” y “directo”.

20 La preparación puede utilizarse *per se* o puede formularse como ingrediente activo en una composición farmacéutica.

25 Por tanto, según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención.

30 Los métodos para formular el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención como ingrediente activo en una composición farmacéutica, y los métodos para aprovechar dicha composición farmacéutica se describen en la presente a continuación.

Tal como se describió anteriormente, en virtud de su capacidad para unirse de modo específico a una región, tal como una región funcional, de la NIK, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse para regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK asociada con dicha región funcional.

35 Por tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK. El método se realiza poniendo en contacto la molécula de NIK con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención.

Preferiblemente, el método se utiliza para regular la actividad bioquímica de una molécula de NIK humana.

40 Tal como se describió anteriormente, puesto que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse de modo específico a la NIK fosforilada de tal manera que infrarregula la actividad quinasa de NIK, y puesto que dicha actividad es necesaria para la activación de NF-κB, como se ha detallada a fondo en la sección “Campo y antecedentes de la invención” anterior, el método puede utilizarse para infrarregular óptimamente la actividad NF-κB.

45 Por tanto, en virtud de permitir la infrarregulación óptima de la actividad NF-κB, el método puede utilizarse para tratar óptimamente en un individuo una enfermedad asociada con una actividad NF-κB desregulada, en particular una actividad NF-κB excesiva o constitutiva.

Cuando se utiliza el método según este aspecto de la presente invención para tratar la enfermedad en el individuo, el contacto de la molécula de NIK con el anticuerpo o con el fragmento de anticuerpo puede realizarse de forma ventajosa administrando el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a un individuo.

50 Preferiblemente, la administración del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo se realiza administrando la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención como ingrediente activo.

El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se administra preferiblemente para lograr un nivel suficiente de fragmento

de anticuerpo unido al antígeno diana para lograr una regulación deseada de la actividad bioquímica.

Los expertos en la técnica, por ejemplo un médico, más preferiblemente un médico especializado en la enfermedad, poseen la experiencia requerida para determinar un protocolo terapéutico adecuado, incluyendo una vía de administración adecuada, y una dosificación adecuada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, para tratar de manera eficaz la enfermedad según las indicaciones de la presente invención.

La NIK normalmente es una molécula intracelular y, como tal, para poner en contacto óptimamente el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con la molécula de NIK en una célula, tal como una célula que se caracteriza por una actividad NF- κ B desregulada, el método se practica preferiblemente de tal forma que se facilite el contacto del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo con la molécula de NIK dentro de la célula.

Este contacto intracelular puede facilitarse de diversas maneras, dependiendo de la aplicación y del propósito.

Por ejemplo, dicho contacto intracelular puede realizarse poniendo en contacto la célula con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en asociación con un vehículo con base de lípidos capaz de facilitar la penetración del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo hacia el interior de la célula.

Como alternativa, dicho contacto intracelular puede realizarse transformando genéticamente la célula con un vector de expresión capaz de expresar el fragmento de anticuerpo de la presente invención de manera intracelular.

Los tipos adecuados de vehículos lipídicos para facilitar la entrada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo hacia el interior de la célula incluyen liposomas e inmunoliposomas. Los inmunoliposomas, en virtud de permitir el transporte específico del tipo celular de moléculas, pueden emplearse de modo ventajoso para transportar de manera selectiva el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a células afectadas por una enfermedad, en las que dichas células expresan antígenos de superficie distintivos, tales como marcadores de la inflamación en células que muestran una respuesta inmunológica patológica (por ejemplo, CD25 o CD69 en linfocitos T activados), o antígenos asociados a tumores en células malignas (por ejemplo, HER-2 en células de adenocarcinoma, MAGE-1 en células de melanoma, y similares).

En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para utilizar dichos vehículos con base de lípidos para el transporte intracelular de moléculas terapéuticas, tales como un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de la presente invención, hacia células enfermas (por ejemplo, se remite a Abra, R.M. *et al.*, 2002, *J. Liposome Res.*, 12:1-3; Park, J.W., 2002, *Breast Cancer Res.*, 4(3):95-99; Bendas, G., 2001, *BioDrugs*, 15:215-224; Maruyama, K., 2000, *Biol. Pharm. Bull.*, 23:791-799; Hong, K. *et al.*, 1999, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 886:293-296; Margalit, R., 1995, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 12:233-261; Storm, G. y Crommelin, D.J., 1997, *Hybridoma*, 16:119-125; Park, J.W. *et al.*, 1997, *Adv. Pharmacol.*, 40:399-435).

En la técnica se realiza habitualmente la producción de un fragmento de anticuerpo recombinante, tal como el fragmento de anticuerpo recombinante de la presente invención, de modo intracelular. Un fragmento de anticuerpo recombinante expresado intracelularmente puede denominarse "intracuerpo" en la técnica. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para utilizar la expresión intracelular de un fragmento de anticuerpo recombinante capaz de unirse de modo específico con una biomolécula para regular una actividad bioquímica, tal como una actividad enzimática, de la biomolécula en una célula (por ejemplo, se remite a Mhashilkar, A.M. *et al.*, 2002, *Gene Ther.*, 9:307-319; Arafat, W. *et al.*, 2000, *Cancer Gene Ther.*, 7:1250-1256; Cohen, P.A. *et al.*, 1998, *Oncogene*, 17:2445-2456; Hassanzadeh, Gh. G. *et al.*, 1998, *FEBS Lett.*, 437:81-86; Richardson, J.H. *et al.*, 1998, *Gene Ther.*, 5:635-644; para unas indicaciones generales para expresar un fragmento de anticuerpo recombinante en una célula se remite, por ejemplo, a der Maur, A.A. *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:45075-45085; Zhu, Q. *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods*, 231:207-222; Wirtz, P. y Steipe, B., 1999, *Protein Sci.*, 8:2245-2250; Ohage, E. y Steipe, B., 1999, *J. Mol. Biol.*, 291: 1119-1128).

La transformación genética de una célula de mamífero con un vector de expresión puede realizarse utilizando cualquiera de diversos métodos de la técnica que se emplean habitualmente, tales como transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores víricos recombinantes. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para practicar dichos métodos (por ejemplo, se remite a Sambrook *et al.*, *infra* y referencias asociadas; Chang *et al.*, en: "Somatic Gene Therapy", CRC Press, Ann Arbor, MI (1995); Vega *et al.*, en: "Gene Targeting", CRC Press, Ann Arbor, MI (1995); Vectors, A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, MA (1988); Gilboa *et al.*, 1986, *Biotechniques*, 4:504-512; para vectores que implican al sistema nervioso central, se remite, por ejemplo, a la patente de EEUU 4.866.042; para métodos de selección positiva-negativa para inducir una recombinación homóloga se remite, por ejemplo, a las patentes de EEUU 5.464.764 y 5.487.992).

A continuación en la presente se proporcionan más indicaciones con respecto a la producción y el aprovechamiento de vectores de expresión para expresar un fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula.

Tal como se describió anteriormente en la presente, el método según este aspecto de la presente invención puede utilizarse para tratar óptimamente una enfermedad asociada con una actividad NF- κ B desregulada. La actividad NF-

κB en general está implicada en la activación de una gama muy amplia de respuestas inmunológicas, incluyendo las desencadenadas por los receptores de antígenos de linfocitos, los receptores coestimulantes de linfocitos, los receptores de TNF, los receptores de interleuquina, LMP1, RANK, el receptor Toll humano, y el lipopolisacárido (LPS). Puesto que estos receptores están implicados en mediar en una gama muy amplia de tipos de respuestas inmunológicas, el método según este aspecto de la presente invención puede utilizarse para tratar numerosas enfermedades cuya patogénesis está asociada con dichas respuestas inmunológicas. Estas enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades relacionadas con trasplantes, y enfermedades alérgicas. Por ejemplo, se ha demostrado que el NF-κB está implicado en la patogénesis de diversos ejemplos de dichas enfermedades, incluyendo enfermedades alérgicas, tales como asma, enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad del intestino inflamatoria, aterosclerosis, y enfermedad de Alzheimer, y enfermedades relacionadas con trasplantes, tales como rechazo de injertos. Además, se ha demostrado que una señalización de NF-κB desregulada está asociada con diversas enfermedades malignas.

Como tal, el método según este aspecto de la presente invención puede emplearse para tratar con eficacia enfermedades, tales como enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, relacionadas con trasplantes, alérgicas y malignas.

Los ejemplos específicos de enfermedades que pueden tratarse según este aspecto de la presente invención se listan a continuación en la presente.

Tal como se describió anteriormente en la presente, el antígeno diana, que es un polipéptido, puede obtenerse de diversas maneras.

Preferiblemente, el antígeno diana se obtiene mediante una metodología de síntesis química convencional.

Como alternativa, el antígeno diana puede obtenerse mediante ruptura proteolítica de la NIK expresada en la naturaleza, o puede obtenerse a través de técnicas recombinantes convencionales empleando sistemas de expresión *in vitro* (por ejemplo, se remite a Sambrook *et al.*, infra y referencias asociadas).

El antígeno diana puede sintetizarse químicamente utilizando, por ejemplo, técnicas en fase sólida convencionales. Estas técnicas incluyen síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parciales, condensación de fragmentos, y síntesis en disolución clásica. Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, se remite a Stewart *et al.*, en "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed., Pierce Chemical Company (1984)).

Un polipéptido sintético puede purificarse mediante un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución preparativa, tal como se describe en Creighton, T. (Proteins, structures and molecular principles, W.H. Freeman and Co., N.Y. (1983)), y su secuencia de aminoácidos puede confirmarse mediante procedimientos de secuenciación de aminoácidos convencionales.

Tal como se describió anteriormente en la presente, la preparación preferiblemente se obtiene inmunizando un mamífero con el antígeno diana.

La generación de la preparación *in vivo* puede realizarse de modo ventajoso mediante la inyección repetida del antígeno diana a un mamífero en presencia de un adyuvante según un programa que refuerza la producción de anticuerpos en el suero. En los casos en los que el antígeno diana es demasiado pequeño para producir una respuesta inmunogénica adecuada (denominado en la técnica "hapteno"), el hapteno puede acoplarse a un vehículo antígenicamente neutro, tal como un vehículo de hemocianina de lapa (KLH) o de albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero bovina (BSA)) (por ejemplo, se remite a las patentes de EEUU nº 5.189.178 y 5.239.078). El acoplamiento del hapteno con el vehículo puede realizarse utilizando diversos métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un acoplamiento directo a los grupos amino, seguido opcionalmente por una reducción del enlace imino formado. Como alternativa, el vehículo puede acoplarse utilizando agentes de condensación, tales como dicitohexilcarbodiimida u otros agentes deshidratantes de carbodiimida. También pueden utilizarse compuestos conectores para realizar el acoplamiento; en Pierce Chemical Company, Rockford, IL, están disponibles conectores homobifuncionales y heterobifuncionales. El complejo inmunogénico resultante puede entonces inyectarse en sujetos mamíferos adecuados, tales como ratones, conejos y similares. Tras la generación *in vivo* de un anticuerpo, su valoración sérica en el mamífero hospedante puede medirse con facilidad utilizando procedimientos de inmunoensayo que son muy conocidos en la técnica.

Tal como se describió anteriormente en la presente, la preparación puede comprender, de forma ventajosa, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo humanizado.

Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125023 (publicada el 14 de noviembre, 1984); Taniguchi *et al.*, solicitud de patente europea 171496 (publicada el 19 de febrero, 1985); Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173494 (publicada el 5 de marzo, 1986); Neuberger *et al.*, solicitud PCT WO 8601533 (publicada el 13 de marzo, 1986); Kudo *et al.*, solicitud de

patente europea 184187 (publicada el 11 de junio, 1986); Robinson *et al.*, solicitud de patente internacional nº WO 8702671 (publicada el 7 de mayo, 1987); Riechmann *et al.*, y Harlow y Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra.

5 Los “anticuerpos humanos” son moléculas que contienen la región variable y constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos totalmente humanos son particularmente adecuados para un uso terapéutico, puesto que la inmunogenicidad antiidiotípica se verá significativamente reducida o, de manera ideal, estará ausente. Un método para la preparación de anticuerpos totalmente humanos consiste en la “humanización” del sistema inmunológico humoral de ratones, es decir, la producción de razas de ratones capaces de producir Ig humana (xenorratones) mediante la introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes Ig endógenos han sido inactivados. Los loci de Ig son extremadamente complejos en términos de su estructura física y de los procesos de redistribución y expresión de genes requeridos para producir, en último término, una amplia respuesta inmunológica. La diversidad de anticuerpos se genera principalmente mediante la redistribución combinatoria entre los diferentes genes V, D y J presentes en los loci de Ig. Estos loci también contienen los elementos reguladores intercalados, que controlan la expresión del anticuerpo, la exclusión alélica, la conmutación de clase y la maduración de la afinidad. La introducción de transgenes de Ig humanos no redistribuidos en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación de ratón es compatible con los genes humanos. Además, pueden obtenerse hibridomas que segreguen hu-mAb específicos de antígeno de diversos isotipos mediante la inmunización de xenorratones con antígenos.

10 Los anticuerpos totalmente humanos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Méndez *et al.* (1997); Buggeman *et al.* (1991); Tomizuka *et al.* (2000); patente WO 98/24893).

15 Tal como se emplea en la presente, el término “muteínas” se refiere a análogos de la NIK, en los que uno o más de los restos aminoácidos de los componentes de NIK que aparecen en la naturaleza se reemplaza por diferentes restos aminoácidos, o están deletados, o uno o más restos aminoácidos se añade a la secuencia original de la NIK, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes comparado con la NIK original. Estas muteínas se preparan mediante técnicas de síntesis y/o de mutagénesis dirigida a sitio conocidas, o mediante cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

20 Las muteínas según la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una NIK, según la presente invención, bajo condiciones rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones de hibridación y posterior lavado, que los expertos en la técnica denominan de modo convencional “rigurosas”. Véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook *et al.* (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

25 Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen unas condiciones de lavado a 12 °C-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio, por ejemplo en 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37 °C durante 30-60 minutos, y después 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica comprenderán que las condiciones de rigurosidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se emplean sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

30 Cualquier muteína de este tipo preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de la NIK como para tener una actividad sustancialmente similar, o aún mejor, que la de la NIK.

35 En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos 40% de coincidencia u homología con la secuencia de aminoácidos de NIK. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o lo más preferiblemente al menos 90% de coincidencia u homología con ésta.

40 La coincidencia refleja la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. En general, la coincidencia se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido, o de aminoácido a aminoácido, de las dos secuencias polinucleotídicas o las dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando.

45 Para las secuencias en las que no existe una correspondencia exacta puede determinarse un “porcentaje de coincidencia”. En general, las dos secuencias que se están comparando se alinean para conseguir una máxima correlación entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “huecos” en una o en ambas secuencias para potenciar el grado de alineamiento. El porcentaje de coincidencia puede determinarse a lo largo de la longitud completa de cada una de las secuencias que se están comparando (el denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias con una longitud igual o muy similar, o en longitudes más cortas definidas (el denominado alineamiento local), que es más adecuado para secuencias con longitudes distintas.

Los métodos para comparar la coincidencia y la homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden utilizarse los programas disponibles en the Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux, J. *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.*, 11 de enero, 1984, 12(1 Pt 1):387-395), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de coincidencia entre dos polinucleótidos, y el porcentaje de coincidencia y el porcentaje de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT emplea el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (*J. Theor. Biol.*, 1981, 21 de julio, 91(2):379-380, y *J. Mol. Biol.*, 25 de marzo, 1981, 147(1):195-197, 1981), y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la coincidencia y/o la similitud entre secuencias también son conocidos en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 5 de octubre, 1990, 215(3):403-410; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, julio de 1990, 87(14):5509-5513; Altschul S.F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1 de septiembre, 1991, 25(17):3389-3402, accesible a través de la página inicial del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson, W.R., *Methods Enzymol.*, 1990, 183:63-98; Pearson, J. *J. Mol. Biol.*, 13 de febrero, 1998, 276(1):71-84).

Las muteínas de NIK que pueden utilizarse según la presente invención, o los ácidos nucleicos que las codifican, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidos de forma habitual por los expertos en la técnica sin experimentación innecesaria, basándose en las indicaciones y las enseñanzas presentadas en la presente.

Los cambios preferidos para las muteínas según la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de NIK pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de forma que la sustitución entre los miembros del grupo conservarán la función biológica de la molécula. Es evidente que también pueden realizarse inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en particular si las inserciones o las deleciones implican sólo a unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminen o desplacen aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional, por ejemplo restos cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas mediante dichas deleciones y/o inserciones están dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla B, y lo más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla C.

30 TABLA A: Grupo preferido de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn

Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA B: Grupo más preferido de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

TABLA C: Grupo lo más preferido de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro

Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Trp

5 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener muteínas de NIK, para su uso en la presente invención, incluyen cualquier etapa de métodos conocidos, tales como los presentados en las patentes de EEUU 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark *et al.*; 5.116.943, de Koths *et al.*; 4.965.195, de Namen *et al.*; 4.879.111, de Chong *et al.*; y 5.017.691, de Lee *et al.*; y las proteínas sustituidas de lisina presentadas en la patente de EEUU nº 4.904.584 (Shaw *et al.*).

10 Los "derivados funcionales", tal como se emplean en la presente, incluyen los derivados de NIK y sus muteínas que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos, o son adiciones a los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de NIK y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

15 Una "fracción activa" según la presente invención puede ser, por ejemplo, un fragmento de NIK. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que mantiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos pueden prepararse con facilidad eliminando aminoácidos de cualquier extremo de la molécula de NIK, y ensayando el fragmento resultante para su actividad. Se conocen proteasas que eliminan un aminoácido cada vez del N-terminal o del C-terminal de un polipéptido y, por tanto, la determinación de los fragmentos que conservan la actividad biológica deseada implica sólo la experimentación habitual.

20 Como fracciones activas de la NIK, sus muteínas y proteínas fusionadas, la presente invención incluye además cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína por sí sola o junto con moléculas asociadas o restos unidos a ésta, por ejemplo restos azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o de los restos azúcar en sí mismos, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la NIK.

25 El término "sales" en la presente se refiere a sales de los grupos carboxilo y a sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula de NIK o de sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, sales férricas o de cinc y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe mantener la actividad biológica de NIK.

30

La expresión "circularmente permutado", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula lineal en que los terminales se han unido, directamente o a través de un conector, para producir una molécula circular, y después la molécula circular se abre en otro sitio para producir una nueva molécula lineal con terminales diferentes de los terminales de la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen las moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se circularizado y después se ha abierto. Por tanto, una molécula circularmente permutada puede sintetizarse de novo como una molécula lineal y nunca someterse a una etapa de circularización y apertura. La permutación circular concreta de una molécula se indica entre paréntesis que contienen los restos aminoácidos entre los que se elimina el enlace peptídico. Las moléculas circularmente permutadas, que pueden incluir ADN, ARN y proteínas, son moléculas monocatenarias, que tienen sus terminales normales fusionados, a menudo a través de un conector, y contienen nuevos terminales en otra posición. Véase Goldenberg *et al.*, J. Mol. Biol., 165:407-413 (1983), y Pan *et al.*, Gene, 125:111-114 (1993).

La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionar los extremos para formar una molécula circular, y después cortar la molécula circular en un sitio diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con terminales diferentes. Por tanto, la permutación circular tiene el efecto de conservar fundamentalmente la secuencia y la coincidencia de los aminoácidos de una proteína mientras que genera nuevos terminales en diferentes sitios.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanizados son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos genéticamente modificados que tienen porciones (preferiblemente mínimas) que se derivan de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) están reemplazadas por restos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, una rata o un conejo, que tenga la funcionalidad deseada. En algunos casos, los restos de las regiones de marco de Fv del anticuerpo humano son reemplazadas por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que se no se encuentren en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la región determinante de la complementariedad o del marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de la complementariedad se corresponden con las del un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las regiones marco se corresponden con las de una secuencia consenso humana pertinente. Los anticuerpos humanizados también contienen óptimamente al menos una porción de una región constante de un anticuerpo, tal como una región Fc, generalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol, 2:593-596). Los métodos para humanizar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos importados, que se obtienen generalmente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse fundamentalmente como se ha descrito (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science, 239:1534-1536; patente de EEUU nº 4.816.567), sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad humanas con las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de roedor. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser generalmente anticuerpos humanos en los que algunos de los restos de la región determinante de la complementariedad y puede que algunos restos del marco están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo los bancos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol, 222:581; Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol., 147:86-95). Los anticuerpos humanizados también pueden prepararse introduciendo secuencias que codifican loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, en ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición antigénica, se observa una producción de anticuerpos humanos en estos animales que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje de la cadena y el repertorio de anticuerpos. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para practicar dicho enfoque (por ejemplo, se remite a las patentes de EEUU nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Lonberg *et al.*, 1994, Nature, 368:856-859; Morrison, 1994, Nature, 368:812-813; Fishwild *et al.*, 1996, Nature Biotechnology, 14:845-851; Neuberger, 1996, Nature Biotechnology, 14:826; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93).

Tal como se describió anteriormente en la presente, un fragmento de anticuerpo de la presente invención puede expresarse de modo ventajoso intracelularmente utilizando un vector de expresión.

Un enfoque preferido para modificar genéticamente una célula de un individuo con un vector de expresión es utilizar un vector vírico. Los vectores víricos ofrecen varias ventajas, incluyendo una mayor eficacia de transformación y de

- 5 transporte dirigido a tipos celulares específicos y de propagación en éstos. Los vectores víricos también puede modificarse con receptores o ligandos específicos para alterar la especificidad de diana a través de receptores de células específicas, tales como receptores de células de cáncer. Esta capacidad de transporte dirigido puede utilizarse para dirigir la expresión de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula caracterizada por una actividad NF- κ B desregulada.
- 10 Los vectores retrovíricos representan una clase de vectores adecuados para su uso con la presente invención. Los retrovirus defectuosos se emplean habitualmente como vectores para modificar genéticamente células de mamífero, tales como células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos y células de la médula ósea, para que expresen proteínas recombinantes. Pueden retirarse porciones del genoma retrovírico para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa, y los retrovirus con replicación defectuosa pueden entonces encapsidarse en viriones, que pueden emplearse para infectar células diana a través del uso de un virus auxiliar empleando técnicas convencionales. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para generar un vector retrovírico capaz de expresar una proteína recombinante en una célula de mamífero (por ejemplo, se remite a Miller, A.D., 1990, *Blood*, 76:271; Sambrook *et al.*, *infra* y referencias asociadas).
- 15 Otro vector de expresión adecuado puede ser un vector adenovírico. Los vectores adenovíricos son vectores de transferencia de genes que han sido estudiados a fondo y que se emplean habitualmente. Las ventajas clave de los vectores adenovíricos incluyen una eficacia de transducción relativamente alta en células en división y quiescentes, un tropismo natural hacia una amplia gama de tejidos epiteliales, y la fácil producción de valoraciones altas. El ADN adenovírico se transporta al núcleo pero no se integra en él. Por tanto, el riesgo de mutagénesis con vectores adenovíricos se minimiza. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para producir y aprovechar los vectores adenovíricos para tratar enfermedades (por ejemplo, se remite a Russel, W.C., 2000, *J. Gen. Virol.*, 81:57-63; para indicaciones con respecto al uso de vectores adenovíricos para el tratamiento del cáncer se remite, por ejemplo, a Seth *et al.*, *Adenoviral vectors for cancer gene therapy*, en: P. Seth (ed.), *Adenoviruses: Basic biology to Gene Therapy*, Landes, Austin, TX, pp. 103-120 (1999)).
- 20 Un ejemplo específico de un vector adenovírico adecuado es el vector derivado de adenovirus Ad-TK. Este vector expresa un gen de timidina quinasa (TK) de herpesvirus para la selección positiva o negativa e incluye un módulo de expresión para las secuencias recombinantes deseadas. Este vector puede utilizarse para infectar células que tienen un receptor adenovírico que incluye la mayoría de los cánceres de origen epitelial (Sandmair *et al.*, 2000, *Hum. Gene. Ther.*, 11:2197-2205).
- 25 Un vector de expresión vírico adecuado también puede ser un vector adenovírico/retrovírico quimérico que combina componentes retrovíricos y adenovíricos, y que ha demostrado ser más eficaz que los vectores de expresión tradicionales. En la bibliografía de la técnica se proporcionan amplias indicaciones para producir y aprovechar dichos vectores (por ejemplo, se remite a Pan *et al.*, 2002, *Cancer Letters*, 184:179-188).
- 30 El vector de expresión puede administrarse de diversos modos. Si se emplean vectores víricos, el procedimiento puede aprovechar su especificidad de diana y, por consiguiente, no es necesario que dichos vectores se administren localmente en un sitio anatómico afectado por la enfermedad. Sin embargo, la administración local puede proporcionar un tratamiento más rápido y eficaz. La administración de vectores víricos también puede realizarse, por ejemplo mediante una inyección intravenosa o subcutánea al individuo. Tras la inyección, los vectores víricos estarán circulando hasta que reconozcan las células hospedantes con la especificidad de diana apropiada para su infección.
- 35 Tal como se describió anteriormente en la presente, la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención como ingrediente activo.
- 40 Tal como se emplea en la presente, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El objetivo de una composición farmacéutica es facilitar la administración de los ingredientes activos a un organismo.
- 45 En la presente, la expresión "ingredientes activos" se refiere al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo de la presente invención que produce el efecto biológico.
- 50 En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden ser intercambiables, se refieren a un vehículo o a un diluyente que no provoque una irritación significativa en un organismo y que no abroge la actividad biológica y las propiedades de los ingredientes activos administrados. Se incluyen los adyuvantes en estas expresiones.
- 55 En la presente, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

5 Las vías de administración adecuadas de la composición farmacéutica pueden incluir, por ejemplo, la vía oral, rectal, transmucósica, en especial la administración transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo la inyección intramuscular, subcutánea e intramedular, así como la inyección intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente a una región de un tejido del individuo.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse mediante procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

15 Así, las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse de una manera convencional empleando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares, que faciliten el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que puedan ser utilizadas de modo farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucósica, en la formulación se emplean penetrantes apropiados para la barrera que se quiere permear. Estos penetrantes son conocidos en general en la técnica.

20 Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse con facilidad combinando los ingredientes activos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por el paciente. Las preparaciones farmacológicas para un uso oral pueden prepararse utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y
25 procesando la mezcla de gránulos, después de añadir las sustancias auxiliares adecuadas si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como
30 polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o sus sales, tales como alginato de sodio.

35 Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este objetivo pueden utilizarse disoluciones de azúcares concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Pueden añadirse tintes o pigmentos a los comprimidos o a los revestimientos de las grageas para su identificación o para caracterizar las diferentes combinaciones de dosis de ingredientes activos.

40 Las composiciones farmacéuticas que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga, tal como lactosa, ligantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

45 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o de pastillas formuladas de la manera convencional.

50 Para la administración mediante inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso según la presente invención se transportan de manera conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con la ayuda de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo de gelatina, para su uso en un dispensador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo de los ingredientes activos y una base para polvos adecuada, tal como lactosa o almidón.

55 La composición farmacéutica descrita en la presente puede formularse para la administración parenteral, por ejemplo, mediante una inyección en embolada o una infusión continua. Las formulaciones para la inyección pueden

presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, pueden prepararse suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones para inyección con base de agua o de aceite apropiadas. Los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que
10 aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

Como alternativa, los ingredientes activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo una disolución con base acuosa estéril apirógena, antes de su uso.

15 La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el objetivo
20 propuesto. De modo más específico, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención) capaz de prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad, o de prolongar la supervivencia del individuo que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, en especial a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente.

25 Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y con cultivos celulares. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr una concentración o una valoración deseada. Esta información puede utilizarse para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos.

30 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y con cultivos celulares y en los estudios con animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, la vía de
35 administración y la dosificación exactas pueden ser elegidas por cada médico a la vista del trastorno del paciente (por ejemplo, se remite a Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, p. 1).

La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse de forma individual para proporcionar unos niveles plasmáticos o cerebrales de los ingredientes activos que sean suficientes para ejercer un efecto terapéutico deseado (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará en cada preparación, pero puede estimarse a partir de los
40 datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden utilizarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y del grado de respuesta del trastorno que se va a tratar, la dosificación puede ser una única administración o una pluralidad de administraciones, durando el transcurso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se logre la curación o la disminución del estado de enfermedad.

45 La cantidad de una composición que se va a administrar depende, por supuesto, del individuo que se está tratando, de la gravedad de la enfermedad, de la vía de la administración, del criterio del médico encargado, etc.

Las composiciones de la presente invención, si se desea, pueden presentarse en un envase o un dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen los ingredientes activos. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase de blísteres. El envase o el dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones
50 para la administración. El envase o el dispositivo dispensador también puede venir acompañado de una nota asociada al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, reflejando dicha nota la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Esta nota, por ejemplo, puede ser una etiqueta con la aprobación por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos con receta, o un inserto del producto aprobado.
55 Las composiciones que comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente adecuado, y etiquetarse

para el tratamiento de un trastorno indicado, como se detalló anteriormente.

Tal como se describió anteriormente en la presente, la presente invención puede utilizarse para tratar una enfermedad asociada con una respuesta inmunológica patológica.

5 Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo I (inmediata o mediada por IgE), enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo II (mediada por anticuerpos), enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo IV (mediada por linfocitos T), enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH), enfermedades autoinmunitarias, y enfermedades asociadas con el trasplante de un injerto.

10 Otros ejemplos de enfermedades asociadas con la hipersensibilidad incluyen, por ejemplo, enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo III (mediada por el complejo inmunológico), enfermedades asociadas con la inflamación, enfermedades asociadas con una infección, y enfermedades asociadas con la hipersensibilidad idiopática.

15 Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo I incluyen enfermedades alérgicas, tales como asma, erupciones cutáneas, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia a venenos, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a fármacos, alergia a picaduras de insectos, alergia a la caspa de animales, alergia a plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa, y alergias alimentarias.

20 Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo II incluye enfermedades reumatoideas, enfermedades autoinmunitarias reumatoideas, artritis reumatoide (Krenn, V. *et al.*, 2000, *Histol. Histopathol.*, 15:791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel *et al.*, 2001, *Arthritis Res.* 3:189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Erikson, J. *et al.*, 1998, *Immunol. Res.*, 17:49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau, Y. *et al.*, 1999, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6:156; Chan, O.T. *et al.*, 1999, *Immunol. Rev.*, 169:107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, enfermedades autoinmunitarias pancreáticas, diabetes, diabetes de tipo I (Zimmet, P., 1996, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 34, supl.:S125), enfermedades tiroideas, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi, J., 2000, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 29:339), tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen, H. y Yu, S., 2000, *J. Immunol.*, 165(12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda, N. *et al.*, *Nippon Rinsho*, 1999, 57(8):1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma, T., *Nippon Rinsho*, 1999 58(9):1759), enfermedades reproductivas autoinmunitarias, enfermedades del ovario, autoinmunitaria ovárica (Garza, K.M. *et al.*, *J. Reprod. Immunol.*, 1998, 37(2):87), infertilidad antiesperma autoinmunitaria (Diekman, A.B. *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2000, 43(3):134), pérdida fetal repetida (Tincani, A. *et al.*, *Lupus*, 1998, 7, supl. 2:S107-109), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunitarias neurológicas, esclerosis múltiple (Cross, A.H. *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, 2001, 112(1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron, L. *et al.*, *J. Neural Transm. Suppl.*, 1997, 49:77), miastenia gravis (Infante, A.J. y Kraig, E., *Int. Rev. Immunol.*, 1999, 18(1-2):83), neuropatías motoras (Kornberg, A.J., *J. Clin. Neurosci.*, 2000, 7(3):191), síndrome de Guillain-Barre, neuropatías y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki, S., *Am. J. Med. Sci.*, 2000, 319(4):234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori, M., *Am. J. Med. Sci.*, 2000, 319(4):204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofias cerebelares, atrofias cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sideham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine, J.C. y Honnorat, J., *Rev. Neurol. (París)*, 2000, 156(1):23), neuropatías, neuropatías disimunitarias (Nobile-Orazio, E. *et al.*, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.*, 1999, 50:419), neuromiotonia, neuromiotonia adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent, A. *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, 841:482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, aterosclerosis (Matsuura, E. *et al.*, *Lupus*, 1998, 7, supl. 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala, O., *Lupus*, 1998, 7, supl. 2:S132), trombosis (Tincani, A. *et al.*, *Lupus*, 1998, 7, supl. 2:S107-109), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik, S. *et al.*, *Wein Klin Wochenschr.*, 2000, 112(15-16):660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes, S. *et al.*, *Semin. Thromb. Hemost.*, 2000, 26(2):157), vasculitis, vasculitis de vasos pequeños necrotizante, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis necrotizante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis crescética (Noel, L.H., *Ann. Med. Interne (París)*, 2000, 151(3):178), síndrome antifosfolípidos (Flamholz, R. *et al.*, *J. Clin. Apheresis*, 1999, 14(4):171), insuficiencia cardíaca, anticuerpos de β -adrenoreceptores de tipo agonista en la insuficiencia cardíaca (Wallukat, G. *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1999, 83(12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia, F., *Ann. Ital. Med. Int.*, 1999, 14(2):114), anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov, D.G. *et al.*, *Leuk. Lymphoma*, 1998, 28(3-4):285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunitarias del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad intestinal inflamatoria crónica (García Herola, A. *et al.*, *Gastroenterol. Hepatol.*, enero de 2000, 23(1):16), enfermedad celíaca (Landau, Y.E. y Shoenfeld, Y., *Harefuah*, enero de 2000, 138(2):122), enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, miositis, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren (Feist, E. *et al.*, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, 123(1):92), enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli, D. *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 1999, 53(5-6):234), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis autoinmunitaria (Manns, M.P., *J. Hepatol.*, 2000, 33(2):326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg, C.P. *et al.*, *Eur. J.*

Gastroenterol. Hepatol., 1999, 11(6):595).

Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo III incluyen enfermedades mediadas por células efectoras inmunológicas, tales como, por ejemplo, neutrófilos o macrófagos activados, por ejemplo, por complejos inmunológicos a través de receptores de Fc, tales como, por ejemplo, receptores de Fc γ .

5 Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo IV incluyen enfermedades reumatoides, artritis reumatoide (Tisch, R. y McDevitt, H.O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91(2):437), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Datta, S.K., Lupus, 1998, 7(9):591), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, enfermedades pancreáticas, enfermedades autoinmunitarias pancreáticas, diabetes de tipo I (Castano, L. y Eisenbarth, G.S., Ann. Rev. Immunol., 8:647), enfermedades tiroideas, enfermedades autoinmunitarias tiroideas, enfermedad de Graves (Sakata, S. *et al.*, Mol. Cell Endocrinol., 1993, 92(1):77), enfermedades ováricas (Garza, K.M. *et al.*, J. Reprod. Immunol., 1998, 37(2):87), prostatitis, prostatitis autoinmunitaria (Alexander, R.B. *et al.*, Urology, 1997, 50(6):893), síndrome poliglandular, síndrome poliglandular autoinmunitario, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I (Hara, T. *et al.*, Blood, 1991, 77(5):1127), enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunitarias, esclerosis múltiple, neuritis, neuritis óptica (Soderstrom, M. *et al.*, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1994, 57(5):544), miastenia gravis (Oshima, M. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1990, 20(12):2563), síndrome de la persona rígida (Hiemstra, H.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(7):3988), enfermedades cardiovasculares, autoinmunitaria cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto, E. *et al.*, J. Clin. Invest., 1996, 98(8):1709), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (Semple, J.W. *et al.*, Blood, 1996, 87(10):4245), autoinmunitaria antilinfocitos T auxiliares (Caporossi, A.P. *et al.*, Viral Immunol., 1998, 11(1):9), anemia hemolítica (Sallah, S. *et al.*, Ann. Hematol., 1997, 74(3):139), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis, hepatitis activa crónica (Franco, A. *et al.*, Clin. Immunol. Immunopathol., 1990, 54(3):382), cirrosis biliar, cirrosis biliar primaria (Jones, D.E., Clin. Sci. (Colch), 1996, 91(5):551), enfermedades nefríticas, enfermedades autoinmunitarias nefríticas, nefritis, nefritis intersticial (Kelly, C.J., J. Am. Soc. Nephrol., 1990, 1(2):140), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades del oído, enfermedades del tejido conectivo autoinmunitarias, enfermedad del oído autoinmunitaria (Yoo, T.J. *et al.*, Cell Immunol., 1994, 157(1):249), enfermedad del oído interno (Gloddek, B. *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1997, 830:266), enfermedades de la piel, enfermedades cutáneas, enfermedades dérmicas, enfermedades de la piel bullosas, pénfigo vulgar, pénfigoide bulloso, y pénfigo foliáceo.

15 Los ejemplos de enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo retrasado incluyen dermatitis de contacto y erupción por fármacos.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

35 Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunitarias incluyen aterosclerosis (Matsuura, E. *et al.*, Lupus, 1998, 7, supl. 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala, O., Lupus, 1998, 7, supl. 2:S132), trombosis (Tincani, A. *et al.*, Lupus, 1998, 7, supl. 2:S107-109), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik, S. *et al.*, Wein Klin Wochenschr, 2000, 112(15-16):660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes, S. *et al.*, Semin. Thromb. Hemost., 2000, 26(2):157), vasculitis de vasos pequeños necrotizante, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal paucimunitaria y crescénica (Noel, L.H., Ann. Med. Interne (París), 2000, 151(3):178), síndrome antifosfolípidos (Flamholz, R. *et al.*, J. Clin. Apheresis, 1999, 14(4):171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat, G. *et al.*, Am. J. Cardiol., 1999, 83(12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia, F., Ann. Ital. Med. Int., 1999, 14(2):114; Semple, J.W. *et al.*, Blood, 1996, 87(10):4245), anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov, D.G. *et al.*, Leuk. Lymphoma, 1998, 28(3-4):285; Sallah, S. *et al.*, Ann. Hematol., 1997, 74(3):139), autoinmunitaria cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto, E. *et al.*, J. Clin. Invest., 1996, 98(8):1709), y autoinmunitaria antilinfocitos T auxiliares (Caporossi, A.P. *et al.*, Viral Immunol., 1998, 11(1):9).

Los ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunitarias incluyen la artritis reumatoide (Krenn, V. *et al.*, 2000, Histol. Histopathol., 15(3):791; Tisch, R., McDevitt, H.O., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(2):437) y la espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel *et al.*, 2001, Arthritis Res., 3(3):189).

Los ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunitarias incluyen enfermedades autoinmunitarias del páncreas, diabetes de tipo I (Castano, L. y Eisenbarth, G.S., 1990, Ann. Rev. Immunol., 8:647; Zimmet, P., Diabetes Res. Clin. Pract., 1996, 34, supl.:S125), enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi, J., Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 2000, 29:339; Sakata, S. *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol., 1993, 92(1):77), tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen, H. y Yu, S., J. Immunol., 2000, 165(12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda, N. *et al.*, Nippon Rinsho, 1999, 57(8):1810), mixedema idiopático (Mitsuma, T., Nippon Rinsho, 1999, 58(9):1759), autoinmunitaria ovárica (Garza, K.M. *et al.*, J. Reprod. Immunol., 1998, 37(2):87), infertilidad antiesperma autoinmunitaria (Diekman, A.B. *et al.*, Am. J. Reprod. Immunol., 2000, 43(3):134), prostatitis autoinmunitaria (Alexander, R.B. *et al.*, Urology, 1997, 50(6):893) y síndrome poliglandular

autoinmunitológico de tipo I (Hara T. *et al.*, Blood, 1991, 77(5):1127).

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunitológicas incluyen enfermedad intestinal inflamatoria crónica (García Herola, A. *et al.*, Gastroenterol. Hepatol., enero de 2000, 23(1):16), enfermedad celíaca (Landau, Y.E. y Shoenfeld, Y., Harefuah, 2000, 138(2):122), colitis, ileitis y enfermedad de Crohn.

- 5 Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunitológicas incluyen enfermedades de la piel bullosas autoinmunitológicas, tales como pénfigo vulgar, pénfigo bulloso y pénfigo foliáceo.

10 Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunitológicas incluyen hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitológica (Franco, A. *et al.*, Clin. Immunol. Immunopathol., 1990, 54(3):382), cirrosis biliar primaria (Jones, D.E., Clin. Sci. (Colch), 1996, 91(5):551; Strassburg, C.P. *et al.*, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 1999, 11(6):595) y hepatitis autoinmunitológica (Manns, M.P., J. Hepatol., 2000, 33(2):326).

15 Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunitológicas incluyen esclerosis múltiple (Cross, A.H. *et al.*, J. Neuroimmunol., 2001, 112(1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron, L. *et al.*, J. Neural Transm. Suppl., 1997, 49:77), miastenia gravis (Infante, A.J. y Kraig, E., Int. Rev. Immunol., 1999, 18(1-2):83; Oshima, M. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1990, 20:2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg, A.J., J. Clin. Neurosci., 2000, 7(3):191), síndrome de Guillain-Barre, y neuropatías autoinmunitológicas (Kusunoki, S., Am. J. Med., Sci., 2000, 319(4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori, M., Am. J. Med. Sci., 2000, 319(4):204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica, y síndrome de la persona rígida (Hiemstra, H.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(7):3988), síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofas cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sideham, síndrome de Gilles de la Tourette, y poliendocrinopatías autoinmunitológicas (Antoine, J.C. y Honnorat, J., Rev. Neurol (París), 2000, 156(1):23), neuropatías disimunitológicas (Nobile-Orazio, E. *et al.*, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl., 1999, 50:419), neuromiotonia adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent, A. *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1998, 841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom, M. *et al.*, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1994, 57(5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

- 25 Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunitológicas incluyen miositis, miositis autoinmunitológica y síndrome de Sjogren primario (Feist, E. *et al.*, Int. Arch. Allergy Immunol., 2000, 123(1):92) y enfermedad autoinmunitológica del músculo liso (Zauli, D. *et al.*, Biomed. Pharmacother., 1999, 53(5-6):234)

Los ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunitológicas incluyen nefritis y nefritis intersticial autoinmunitológica (Kelly, C.J., J. Am. Soc. Nephrol., 1990, 1(2):140).

- 30 Los ejemplos de enfermedades autoinmunitológicas relacionadas con la reproducción incluyen pérdida fetal repetida (Tincani, A. *et al.*, Lupus, 1998, 7, supl. 2:S107-109).

Los ejemplos de enfermedades del tejido conectivo autoinmunitológicas incluyen enfermedades del oído, enfermedades del oído autoinmunitológicas (Yoo, T.J. *et al.*, Cell Immunol., 1994, 157(1):249), y enfermedades autoinmunitológicas del oído interno (Gloddek, B. *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1997, 830:266).

- 35 Los ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunitológicas incluyen lupus eritematoso sistémico (Erikson, J. *et al.*, 1998, Immunol. Res., 17(1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau, Y. *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1999, 6:156; Chan, O.T. *et al.*, Immunol. Rev., 1999, 169:107).

40 Los ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades micoplásmicas y enfermedades priónicas.

Los ejemplos de enfermedades relacionadas con los trasplantes incluyen rechazo de injertos, rechazo de injertos crónico, rechazo de injertos subagudo, rechazo de injertos hiperagudo, rechazo de injertos agudo y enfermedad del injerto frente al hospedante.

- 45 Los ejemplos de injertos incluyen injertos singeneicos, aloinjertos, xenoinjertos, injertos celulares, injertos de tejidos, injertos de órganos e injertos de apéndices.

Los ejemplos de injertos celulares incluyen injertos de células pluripotenciales, injertos de células progenitoras, injertos de células hematopoyéticas, injertos de células embrionarias e injertos de células nerviosas.

- 50 Los ejemplos de injertos de tejidos incluyen injertos de piel, injertos de hueso, injertos de nervios, injertos de intestino, injertos de córnea, injertos de cartílago, injertos de tejido cardíaco, injertos de válvulas cardíacas, injertos dentales, injertos de folículos pilosos e injertos de músculo.

Los ejemplos de injertos de órganos incluyen injertos de riñón, injertos de corazón, injertos de piel, injertos de hígado, injertos pancreáticos, injertos de pulmón e injertos de intestino.

Los ejemplos de injertos de apéndices incluyen injertos de brazos, injertos de piernas, injertos de manos, injertos de pies, injertos de dedos, injertos de dedos del pie y injertos de órganos sexuales.

5 Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen lesiones, enfermedades neurodegenerativas, úlceras, inflamación asociada con implantes prostéticos, menstruación, choque séptico, choque anafiláctico, síndrome del choque tóxico, caquexia, necrosis, gangrena, inflamación musculoesquelética e inflamación idiopática.

Los ejemplos de implantes prostéticos incluyen implantes de mama, implantes de silicona, implantes dentales, implantes de pene, implantes cardíacos, articulaciones artificiales, dispositivos de reparación de fracturas de huesos, implantes de sustitución de huesos, implantes de administración de fármacos, catéteres, marcapasos, tubos respiratorios e implantes de estenosis.

10 Los ejemplos de úlceras incluyen úlceras de la piel, úlceras de decúbito, úlceras gástricas, úlceras pépticas, úlceras bucales, úlceras nasofaríngeas, úlceras esofágicas, úlceras duodenales, colitis ulcerosa y úlceras gastrointestinales.

15 Los ejemplos de lesiones incluyen abrasiones, magulladuras, cortes, lesiones por punción, laceraciones, lesiones por impacto, concusiones, contusiones, quemaduras térmicas, congelación, quemaduras químicas, quemaduras solares, desecamientos, quemaduras por radiación, quemaduras por radiactividad, inhalación de humo, músculos desgarrados, tirones musculares, tendones desgarrados, tirones de tendones, tirones de ligamentos, ligamentos desgarrados, hiperextensiones, cartílago desgarrado, fracturas óseas, nervios pinzados y heridas de bala.

Los ejemplos de inflamaciones musculoesqueléticas incluyen inflamaciones musculares, miositis, inflamaciones de tendones, tendinitis, inflamaciones de ligamentos, inflamación del cartílago, inflamaciones de articulaciones, inflamaciones sinoviales, síndrome del túnel carpiano e inflamaciones óseas.

20 Tal como se emplea en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Otra ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras estudiar los siguientes ejemplos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, según se reivindican en la sección de las reivindicaciones que aparece a continuación, encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

25 Ejemplos

Se remite a continuación a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones, ilustran la invención de una manera no limitante.

30 En general, la nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio empleados en la presente invención incluyen técnicas de moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Estas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook *et al.*, 1989; "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes I-III, Ausubel, R.M., ed., 1994; Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland, 1989; Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York, 1988; Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1998; las metodologías indicadas en las patentes de EEUU nº 4.666.828, 4.683.202, 4.801.531, 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III, Cellis, J.E., ed., 1994; "Current Protocols in Immunology", volúmenes I-III, Coligan, J.E., ed., 1994; Stites *et al.*, eds., "Basic and Clinical Immunology", 8ª edición, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994; Mishell y Shiigi, eds., "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., Nueva York, 1980; los inmunoensayos disponibles se describen a fondo en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 3.791.932, 3.839.153, 3.850.752, 3.850.578, 3.853.987, 3.867.517, 3.879.262, 3.901.654, 3.935.074, 3.984.533, 3.993.345, 4.034.074, 4.098.876, 4.879.219, 5.011.774 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis", Gait, M.J., ed., 1984; "Nucleic Acid Hybridization", Hames, B.D. y Higgins, S.J., eds., 1985; "Transcription and Translation", Hames, B.D. y Higgins, S.J., eds., 1984; "Animal Cell Culture", Freshney, R.I., ed., 1986; "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press, 1986; "A Practical Guide to Molecular Cloning", Perbal, B., 1984, y "Methods in Enzymology", vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA, 1990; Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSHL Press, 1996.

Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos contenidos en las mismas son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

50 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos capaces de unirse a NIK fosforilada en el aminoácido T559

Tal como se describió anteriormente, no existe ningún tratamiento ni ningún tratamiento satisfactorio disponible para numerosas enfermedades asociadas con una actividad NF- κ B desregulada, incluyendo enfermedades malignas y enfermedades asociadas con respuestas inmunológicas patológicas, tales como enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con trasplantes. Puesto que la NIK es un activador crítico de NF- κ B, una estrategia potencialmente potente para tratar dichas enfermedades implica identificar anticuerpos capaces de unirse de modo específico a NIK, y con ello prevenir o inhibir la activación del NF- κ B por NIK. Estos anticuerpos también tendrán utilidad como reactivos de detección, permitiendo la caracterización de aspectos normales y patológicos de procesos bioquímicos que impliquen a la NIK. Sin embargo, la técnica anterior no ha podido proporcionar anticuerpos adecuados u óptimamente adecuados para dichos objetivos. Se ha indicado que la fosforilación del aminoácido T559 localizado en el bucle de activación de la NIK es importante para su actividad. No se ha indicado ningún anticuerpo adecuado con dicha especificidad.

Por tanto, un anticuerpo candidato para la inhibición de la NIK es aquel que reconozca la NIK fosforilada en el resto aminoácido T559 o sus fragmentos.

Para generar anticuerpos policlonales específicos para la NIK fosforilada, cada uno de los conjuntos solapantes de péptidos derivados del bucle de activación de la NIK que se muestra en la tabla 1 (todos contienen la fosfotreonina en la posición 559 (figura 1)) se utilizaron para inmunizar grupos de conejos.

Tabla 1. Bucle de activación y péptidos utilizados para la inmunización

Denominación del péptido*	Secuencia de aminoácidos
553-566	CGDYIPGT(p)ETHMAPE
553-562	KGDYIPGT(p)ETH
549-560	CSLLTGDYIPGT(p)E
534-566	DFGHAVCLQPDGLGKSLTGDYIPGT(p)ETHMAPE
Bucle de activación	

* los números se corresponden con las coordenadas de aminoácidos del péptido dentro de la secuencia de la NIK.

* Nótese que en el péptido 549-560 y 553-566 se ha añadido una cisteína al extremo N-terminal, y que en el péptido 553-562 se ha añadido una lisina en el extremo N-terminal.

Se observó mediante ELISA (ejemplo 3), utilizando placas de microvaloración revestidas con fosfopéptidos y péptidos no fosforilados, que el péptido fosforilado que aparece en SEQ ID NO:3, de los tres péptidos derivados del bucle de activación ensayados, en el que la treonina fosforilada es el penúltimo aminoácido, era el único péptido eficaz para producir anticuerpos específicos de la versión fosforilada del péptido.

A la vista de los resultados obtenidos con anticuerpos policlonales, se prepararon anticuerpos monoclonales utilizando el péptido fosforilado indicado en SEQ ID NO:3 (549-560) para la inmunización de ratones Balb/C. Se realizaron tres fusiones utilizando bazo y nodo linfático de ratones Balb/C inmunizados, aunque los anticuerpos resultantes no fueron específicos o tenían una baja valoración (ensayados mediante ELISA).

Cuando en lugar de ratones Balb/C se utilizaron ratones SJL inmunizados para las fusiones, se generaron aproximadamente 24 clones que producían anticuerpos muy específicos para el péptido NIK T(p) 559 (ensayados mediante ELISA o análisis de inmunotransferencia Western).

Ejemplo 2: Control de la especificidad de los anticuerpos mediante inmunoprecipitación

Se realizaron otros experimentos para comprobar si los anticuerpos preparados contra el péptido fosforilado 549-560 eran capaces de reconocer la proteína NIK completa, y si eran capaces de diferenciar el estado de fosforilación de la proteína. El escenario experimental utilizado incluía la sobreexpresión de NIK marcada con myc (ejemplo 11) o un mutante de NIK marcado con myc que tiene la treonina en la posición 559 sustituida por alanina en células 293T. Tras la sobreexpresión de NIK, las células se lisaron, y NIK o NIK mutante, incapaz de ser fosforilada, se inmunoprecipitaron (IP) con los anticuerpos monoclonales de los clones 869, 815, 521, 254, 91, 62, 32, 30 ó 3, preparados con el péptido 549-560 fosforilado. La NIK inmunoprecipitada se detectó con un análisis de la inmunotransferencia Western empleando un anticuerpo anti-myc.

De manera más específica, para la sobreexpresión de la NIK se sembraron 3×10^6 células 293T en una placa de 15 cm, y las células se transfectaron de forma transitoria con pCS3MTNIK o pCS3MTNIK559A. Veinticuatro horas después las células se recolectaron y se lisaron en 2 ml de tampón NP-40 al 1%. Se emplearon 100 μ l del lisado para cada IP. La IP se realizó poniendo en contacto el lisado celular con 30 μ l de esferas de proteína G adsorbidas

con los respectivos anticuerpos durante 4 horas a 4 °C. Se realizó un análisis de la inmunotransferencia Western y un control positivo para IP con el anticuerpo anti-myc.

5 El anticuerpo anti-myc detectó ambas formas fosforilada y no fosforilada de la NIK inmunoprecipitada con los anteriores anticuerpos. Los resultados de la figura 4 demuestran que todos los anticuerpos ensayados eran capaces de inmunoprecipitar la NIK. Se descubrió que los clones 869, 815, 521, 254, 91, 62, 32, 30 y 3 eran específicos para la forma fosforilada de la NIK.

Por tanto, los resultados indican que, como resultado del procedimiento empleado, fue posible generar anticuerpos específicos para la especie fosforilada de NIK.

Ejemplo 3: Control de la especificidad del anticuerpo NIK-P4 30.12 mediante ELISA

10 Se empleó el péptido 549-560 no fosforilado control o el tipo fosforilado, a una concentración de 10 ug/ml, para revestir pocillos de una placa de microvaloración. Se cargó el sobrenadante de un cultivo de hibridoma sin diluir del clon NIK-P4 30.12 durante 1 hora a 37 °C a cada uno de los pocillos revestidos. Se empleó anti-ratón HRP (Jackson) a una dilución de 1:10K como anticuerpo secundario, y se midió la DO 405 utilizando un sustrato ABTS.

15 Los resultados observados (figura 5) demuestran que los anticuerpos NIK-P4 30.12 reconocen sólo la forma fosforilada del péptido mediante ELISA.

Ejemplo 4: Demostración de la actividad inhibidora del anticuerpo NIK-P4 30.12 en la señalización a través de CD40 y CD70

20 Los ligandos del receptor de TNF CD70, CD40 y TNF inducen la degradación de I κ B y, por consiguiente, inducen la activación de NF- κ B. Para comprobar si NIK-P4 30.12 es capaz de inhibir la actividad de la NIK, se ensayó el efecto del anticuerpo NIK-P4 30.12 sobre la degradación inducida por un ligando de I κ B,

25 Se cultivaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células Ramos en placas de 6 pocillos y se transfectaron con NIK-P4 30.12 (α -pNIK) o una IgG control no relevante (véase la transfección de proteínas del ejemplo 12), y después de la transfección se indujeron con una dilución 1:4 del medio que contenía ligando CD70 o CD40 (véase la preparación del medio que contienen ligando en el ejemplo 13) durante 20 min y 30 min, respectivamente, o con TNF utilizado a una concentración de 50 ng/ml durante 20 min, o permanecieron sin tratar. Después de la inducción con el ligando, las células se lisaron en 45 μ l de tampón NP40 al 1% + 15 μ l de tampón de carga de las muestras, y se cargaron 30 μ l del lisado en un SDS al 10%-PAGE y se sometieron a un análisis de la inmunotransferencia Western, empleando para la detección del I κ B el anticuerpo anti-I κ B (obtenido en Transduction Laboratories).

30 Se observó (figura 6) que en células no tratadas (control), el I κ B estaba presente en las células transfectadas con IgG o con anti-pNIK. Sin embargo, en todas las células tratadas con ligando, el I κ B se degradó, indicando la activación del NF- κ B. La degradación del I κ B y, por consiguiente, la activación del NF- κ B no se produce en células transfectadas con los anticuerpos NIK-P4 30.12, excepto cuando el ligando empleado es TNF. Este resultado indica que la fosforilación de NIK en el resto T559 es importante para la activación del NF- κ B por CD70 y CD40 y, por tanto, el anticuerpo NIK-P4 30.12 puede utilizarse para terapia en enfermedades en las que la señalización de CD70 y CD40 está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

Ejemplo 5: El anticuerpo anti-fosfoThr559-NIK bloquea la degradación de I κ B inducida por CD40

Se realizó el siguiente experimento para confirmar que la inhibición de la activación de NIK observada con NIK-P4 30.12 no se produce con anticuerpos generados contra otros dominios en la quinasa.

40 Se transfectaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células BJAB con IgG no específica, con anticuerpo específico contra la región N-terminal del dominio quinasa de la NIK (específico para los restos 405-420) (81), o con NIK-P4 30.12. Todas las células transfectadas se trataron con CD40L, como en el ejemplo previo, durante 30 min, o permanecieron sin tratar. Tras el tratamiento, las células se lisaron en tampón NP40 al 1%, y se controló el I κ Ba en la célula mediante un análisis de la inmunotransferencia Western como en el ejemplo anterior.

45 Se observó (figura 7) que CD40 induce la degradación de I κ Ba en células tratadas con CD40. No se observó inhibición de la degradación de I κ Ba utilizando anticuerpos muy eficaces contra una región del dominio quinasa (81) diferente de la región utilizada para desarrollar el anticuerpo NIK-P4 30.12, y el único anticuerpo que inhibió la degradación del I κ Ba fue NIK-P4 30.12. Este resultado indica que los anticuerpos NIK-P4 30.12 generados contra la T559 fosforilada en el bucle de activación de la NIK inhiben la degradación de I κ B y, por consiguiente, inhiben la activación de NF- κ B por un tratamiento con CD40L.

50 Los resultados de los ejemplos 4 y 5 demuestran que la NIK no participa en la activación de la vía canónica por TNF en células linfoblastoides, tales como BJAB y Ramos. Sin embargo, los resultados demuestran que la función de la NIK es crucial para la activación de la vía canónica por otros ligandos, tales como, por ejemplo, CD40L y CD70. Por tanto, los resultados también demuestran que los anticuerpos NIK-P4 30.12 pueden emplearse para identificar

ligandos que inducen la activación mediada por NIK de la vía canónica.

Ejemplo 6: Preparación de un anticuerpo policlonal

Se inmunizaron conejos con los péptidos indicados en SEQ ID NO:1, 2 ó 3, para la generación de anticuerpos policlonales específicos.

5 La primera inmunización se realizó con 100 µg de péptido-KLH que estaba disuelto en adyuvante de Freund completo 1:1 y se inyectó por vía subcutánea. Se realizó una segunda inmunización tres semanas después con la misma cantidad de péptido-KLH y se inyectó por vía intramuscular tres semanas después con adyuvante de Freund incompleto. A estas dos inmunizaciones le siguió un refuerzo con la misma cantidad de péptido-KLH disuelto en PBS y se administró por vía subcutánea con un intervalo de tres semanas.

10 Ejemplo 7: Preparación de anticuerpos monoclonales

Se prepararon anticuerpos monoclonales como se describe en Eshzar, Z., en: "Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine", capítulo 1, Springer, T.A. (eds.), Timothy, A., Plenum Publishing Corp., Nueva York, 1985, utilizando el bazo de ratones SJL positivos expuestos al péptido de SEQ ID NO:7, 11 y 12 del N- y C-terminal de la quinasa para la fusión de bazo y nodo linfático.

15 Se ensayaron sobrenadantes del cultivo de los hibridomas mediante un análisis de la inmunotransferencia Western para detectar la NIK marcada con myc. Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células 293-T en placas de 10 cm y se transfectaron 24 horas después con pCS3MTNIK. Veinticuatro horas después las células transfectadas se recogieron y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis NP40 al 1%. Se cargaron 40 µl del lisado por carril con lisado celular transfectado con pcDNA3 como control (C). Las transferencias Western se sondaron con el respectivo sobrenadante del cultivo de hibridoma.

20 Ejemplo 8: Inmunoprecipitación con suero inmunológico

Para la inmunoprecipitación de la proteína de fusión de NIK recombinante procedente del lisado de proteína transfectante utilizando suero inmunológico, se mezclaron 1,5 µl del suero inmunológico con 25 µl de esferas conjugadas con proteína G y 50 µl de lisado, y el volumen se completó hasta 750 µl con tampón de lisis. La mezcla se incubó a 4 °C durante 2 horas. Tras la incubación, las esferas se lavaron tres veces con tampón de lisis, se hirvieron en 30 µl de tampón de muestra, y se microcentrifugaron a 15.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante (inmunoprecipitado) se recogió y se analizó para la presencia de NIK humana mediante un SDS al 10%-PAGE.

Inmunoprecipitación con el sobrenadante del hibridoma

30 Se empleó un lisado de 239-T que expresaba la proteína NIK marcada con myc como sustrato para ensayar la capacidad de inmunoprecipitación de los anticuerpos monoclonales anti-NIK. Se mezclaron 50 µl de esferas de proteína G con 500 µl de sobrenadante del cultivo de hibridoma y se incubó a aproximadamente 22 °C durante 1 hora. Las esferas se lavaron con tampón de lisis NP-40 al 1% tres veces y se emplearon para la inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación (IP) se realizó durante 2 horas a +4 °C. Después de la IP, las esferas se lavaron tres veces y se hirvieron con 50 µl de tampón Laemli y se cargaron 25 µl de sobrenadante sobre un SDS al 10%-PAGE.

35 Ejemplo 9: Análisis de la inmunotransferencia Western

Para un Biorad de multiselección de transferencia en ranuras de 20 pocillos, se analizó una parte alícuota de 180 µl de lisado procedente de células 293-T transfectadas con PCS3MTNIK mediante un gel preparativo de SDS-PAGE. Como control positivo se empleó un anticuerpo anti-myc a una dilución 1:1.000.

40 Ejemplo 10: ELISA

El lisado procedente de células transfectadas con pcHis-NIK se diluyó en 25 veces en tampón de ensayo, y se emplearon 50 µl/pocillo para revestir pocillos de una placa de ELISA. La detección del péptido acoplado a BSA o NIK revestido se realizó utilizando una dilución 1:100 de suero inmunológico anti-NIK, y el ensayo se reveló utilizando un anticuerpo anti-ratón de oveja conjugado con HRP, con ABTS como sustrato enzimático. Se determinó la DO_{405} de las muestras después de un tiempo de reacción de 20 minutos.

45 Ejemplo 11: Producción de NIK humana recombinante

Para la expresión de la NIK humana recombinante condensada con un marcador de afinidad myc (myc-NIK) o de polihistidina (His-NIK), se transfectaron 3×10^6 ó $1,5 \times 10^6$ células 293-T, respectivamente, con el vector de expresión PCS3MTNIK que codifica la NIK marcada con myc (la secuencia de nucleótidos de NIK del documento WO 9737016) o pcHis-NIK que codifica la NIK marcada con His, respectivamente. Las células se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio $[Ca_3(PO_4)_2]$ en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro utilizando 20 µg o

10 µg de ADN del vector de expresión. Veinticuatro horas después de la transfección, las células transfectadas con PCS3MTINIK o pcHis-NIK se recogieron, se sedimentaron y se lisaron en 1,5 ml o 1 ml, respectivamente, de tampón de lisis de proteína NP-40 al 1%.

Ejemplo 12: Transfección del anticuerpo a la célula

- 5 Para ensayar el efecto de los anticuerpos dentro de las células, el anticuerpo se introdujo en las células empleando el reactivo Pro-Ject de Pierce utilizando el siguiente protocolo: 2×10^5 células se sembraron en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche. Se emplearon 10 µl de reactivo Pro-JectTM (disuelto en 250 µl de metanol o cloroformo) y se evaporaron bajo una campana de flujo laminar durante 2 horas. Se diluyeron 5-10 µg de proteína, el Ab-FITC control o el anticuerpo monoclonal ensayado en 50-100 µl.
- 10 La película de Pro-JectTM secada se hidrató con 50-100 µl de la disolución de la proteína diluida pipeteando arriba y abajo aproximadamente 3 a 5 veces e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos y agitando en vórtice durante unos pocos segundos a una velocidad baja a moderada. El volumen final de la mezcla de reactivo Pro-JectTM/proteína se llevó hasta 1.000 µl con medio exento de suero.
- 15 El medio de las células que se van a ensayar se retira mediante centrifugación, se lava una vez con medio exento de suero y la mezcla de reactivo Pro-JectTM/proteína se transfirió directamente a las células.

Ejemplo 13: Preparación de medio que contiene CD70 o CD40 utilizado para la inducción

- 20 Se transfectaron células 293T con una molécula de una construcción de CD40/CD70 con cremallera de leucina marcada con Flag (Walczak *et al.*, 1999; Fanslow *et al.*, 1994). En esta molécula, el ligando ya está multimerizado en virtud de la cremallera de leucina condensada a ella. El ADN que codifica el ligando con cremallera de leucina marcado con Flag se clonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA (Invitrogen) y se expresó de forma transitoria en células HEK-293. El sobrenadante de estas células se recolectó tres días después de la transfección, se esterilizó mediante filtración y se empleó.

- 25 La cita o la identificación de cualquier referencia bibliográfica en esta solicitud no debe considerarse un reconocimiento de que dicha referencia bibliográfica está disponible como técnica anterior para la presente invención.

El clon de hibridoma NIK-P4 30.12 se depositó en el Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, París, bajo el Tratado de Budapest con el número de depósito I-3095. Los hibridomas se registraron en el CNCM el 2 de octubre, 2003.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.

WALLACH, David

RAMAKRISHNAN, Paraneswaran

5

<120> Anticuerpos contra NIK, su preparación y su uso

<130> 924

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

15 <211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu Thr His Met Ala Pro Glu
 1 5 10

20

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 2

Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu Thr His
 1 5 10

<210> 3

<211> 12

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu
 1 5 10

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp Gly Leu Gly Lys Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu Thr His Met Ala Pro
 20 25 30

Glu

<210> 5

10 <211> 947

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

15 Met Ala Val Met Glu Met Ala Cys Pro Gly Ala Pro Gly Ser Ala Val
 1 5 10 15

Gly Gln Gln Lys Glu Leu Pro Lys Pro Lys Glu Lys Thr Pro Pro Leu
 20 25 30

Gly Lys Lys Gln Ser Ser Val Tyr Lys Leu Glu Ala Val Glu Lys Ser
 35 40 45

Pro Val Phe Cys Gly Lys Trp Glu Ile Leu Asn Asp Val Ile Thr Lys
 50 55 60

Gly Thr Ala Lys Glu Gly Ser Glu Ala Gly Pro Ala Ala Ile Ser Ile
 65 70 75 80

Ile Ala Gln Ala Glu Cys Glu Asn Ser Gln Glu Phe Ser Pro Thr Phe
 85 90 95

Ser Glu Arg Ile Phe Ile Ala Gly Ser Lys Gln Tyr Ser Gln Ser Glu
 100 105 110

Ser Leu Asp Gln Ile Pro Asn Asn Val Ala His Ala Thr Glu Gly Lys
 115 120 125

Met Ala Arg Val Cys Trp Lys Gly Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Lys
 130 135 140

Lys Arg Lys Lys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Ala His Ala Gly Val Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Lys Pro Leu Pro Arg Thr Pro Glu Gln Glu Ser Cys Thr Ile
 165 170 175

Pro Val Gln Glu Asp Glu Ser Pro Leu Gly Ala Pro Tyr Val Arg Asn
 180 185 190

Thr Pro Gln Phe Thr Lys Pro Leu Lys Glu Pro Gly Leu Gly Gln Leu
 195 200 205

Cys Phe Lys Gln Leu Gly Glu Gly Leu Arg Pro Ala Leu Pro Arg Ser
 210 215 220

Glu Leu His Lys Leu Ile Ser Pro Leu Gln Cys Leu Asn His Val Trp
 225 230 235 240

Lys Leu His His Pro Gln Asp Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Thr His
 245 250 255

Pro Phe Pro Tyr Ser Arg Leu Pro His Pro Phe Pro Phe His Pro Leu
 260 265 270

Gln Pro Trp Lys Pro His Pro Leu Glu Ser Phe Leu Gly Lys Leu Ala
 275 280 285

Cys Val Asp Ser Gln Lys Pro Leu Pro Asp Pro His Leu Ser Lys Leu
 290 295 300

Ala Cys Val Asp Ser Pro Lys Pro Leu Pro Gly Pro His Leu Glu Pro
 305 310 315 320

Ser Cys Leu Ser Arg Gly Ala His Glu Lys Phe Ser Val Glu Glu Tyr
 325 330 335

Leu Val His Ala Leu Gln Gly Ser Val Ser Ser Ser Gln Ala His Ser
 340 345 350

Leu Thr Ser Leu Ala Lys Thr Trp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Ser Arg
 355 360 365

Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu Gly Val Leu Leu Thr Glu
 370 375 380

Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His Trp Ala
 385 390 395 400

Thr His Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg
 405 410 415

Met Glu Asp Lys Gln Thr Gly Phe Gln Cys Ala Val Lys Lys Val Arg
 420 425 430

Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu Met Ala Cys Ala Gly Leu Thr
 435 440 445

Ser Pro Arg Ile Val Pro Leu Tyr Gly Ala Val Arg Glu Gly Pro Trp
 450 455 460

Val Asn Ile Phe Met Glu Leu Leu Glu Gly Gly Ser Leu Gly Gln Leu
 465 470 475 480

Val Lys Glu Gln Gly Cys Leu Pro Glu Asp Arg Ala Leu Tyr Tyr Leu
 485 490 495

Gly Gln Ala Leu Glu Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Arg Ile Leu
 500 505 510

His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Ser Asp Gly Ser
 515 520 525

His Ala Ala Leu Cys Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp
 530 535 540

Gly Leu Gly Lys Ser Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu
 545 550 555 560

Thr His Met Ala Pro Glu Val Val Leu Gly Arg Ser Cys Asp Ala Lys
 565 570 575

Val Asp Val Trp Ser Ser Cys Cys Met Met Leu His Met Leu Asn Gly
 580 585 590

Cys His Pro Trp Thr Gln Phe Phe Arg Gly Pro Leu Cys Leu Lys Ile
 595 600 605

Ala Ser Glu Pro Pro Pro Val Arg Glu Ile Pro Pro Ser Cys Ala Pro
 610 615 620

Leu Thr Ala Gln Ala Ile Gln Glu Gly Leu Arg Lys Glu Pro Ile His
 625 630 635 640

Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu Gln
 645 650 655
 Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu Pro
 660 665 670
 Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His Ala
 675 680 685
 Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Glu
 690 695 700
 Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro Glu
 705 710 715 720
 Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu Glu
 725 730 735
 Ser Gly Met Trp Glu Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Pro Ala Pro
 740 745 750
 Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu Gln
 755 760 765
 Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser Gln
 770 775 780
 Pro Phe Ser Leu Glu Glu Gln Glu Gln Ile Leu Ser Cys Leu Ser Ile
 785 790 795 800
 Asp Ser Leu Ser Leu Ser Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys Ala
 805 810 815
 Ser Gln Ser Ser Arg Asp Thr Leu Ser Ser Gly Val His Ser Trp Ser
 820 825 830
 Ser Gln Ala Glu Ala Arg Ser Ser Ser Trp Asn Met Val Leu Ala Arg
 835 840 845
 Gly Arg Pro Thr Asp Thr Pro Ser Tyr Phe Asn Gly Val Lys Val Gln
 850 855 860
 Ile Gln Ser Leu Asn Gly Glu His Leu His Ile Arg Glu Phe His Arg
 865 870 875 880
 Val Lys Val Gly Asp Ile Ala Thr Gly Ile Ser Ser Gln Ile Pro Ala
 885 890 895
 Ala Ala Phe Ser Leu Val Thr Lys Asp Gly Gln Pro Val Arg Tyr Asp
 900 905 910

Met Glu Val Pro Asp Ser Gly Ile Asp Leu Gln Cys Thr Leu Ala Pro
 915 920 925

Asp Gly Ser Phe Ala Trp Ser Trp Arg Val Lys His Gly Gln Leu Glu
 930 935 940

Asn Arg Pro
 945

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp Gly Leu Gly Lys Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu
 20 25

<210> 7

10 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

15 Arg Leu Gly Arg Gly Ser Glu Gly Glu Val His Arg Met Glu Asp Lys
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de éste que detecta de modo específico la quinasa inductora de NF-kappaB endógenamente fosforilada, NIK, que se caracteriza porque dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión al antígeno es capaz de unirse de modo específico a una porción de la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:5 que comprende una treonina fosforilada en la posición del aminoácido 559.
- 2.- El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, humano o anti-antiidiotípico.
- 3.- El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en el que la porción de SEQ ID NO:5 comprende:
- 10 (a) SEQ ID NO:6; o
(b) SEQ ID NO:3.
- 4.- El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- 15 5.- El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fv monocatenario, un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y una CDR.
- 6.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo también es capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK.
- 20 7.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 capaz de detectar de modo específico la NIK fosforilada mediante:
- (a) un análisis de la inmunotransferencia Western;
- (b) ELISA; o
- (c) inmunoprecipitación.
- 25 8.- Un anticuerpo monoclonal generado por el hibridoma NIK-P4 30.12 depositado en el CNCM como nº I-3095, o los fragmentos de este anticuerpo de unión al antígeno.
- 9.- Un clon de hibridoma depositado en el CNCM como nº I-3095.
- 10.- Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 11.- Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para tratar enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias, infecciosas y relacionadas con trasplantes.
- 35 12.- El uso del anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la preparación de una composición farmacéutica para tratar enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias, infecciosas y relacionadas con trasplantes.
- 13.- La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para el tratamiento del asma, la artritis reumatoide, la enfermedad del intestino inflamatoria, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer.
- 14.- El uso de la reivindicación 12, en el que la enfermedad se selecciona del asma, la artritis reumatoide, la enfermedad del intestino inflamatoria, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer.
- 40 15.- Una composición de materia que comprende un sustrato unido covalentemente a un péptido con la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO:3, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una treonina fosforilada en la posición que corresponde a la posición del aminoácido 559 de SEQ ID NO:5, para capturar de modo selectivo el anticuerpo o el fragmento de este anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es capaz de unirse de modo específico al antígeno diana.
- 45 16.- La composición de materia de la reivindicación 15, en la que dicho sustrato es una matriz de cromatografía de afinidad.
- 17.- La composición de materia de la reivindicación 15, en la que dicho sustrato comprende un carbohidrato o un

derivado de dicho carbohidrato.

18.- La composición de materia de la reivindicación 17, en la que dicho carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en agarosa, Sepharose y celulosa.

5 19.- La composición de materia de la reivindicación 15, en la que dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en una esfera, una resina o una superficie de plástico.

20.- Un método para preparar el anticuerpo de la reivindicación 8 que comprende cultivar el clon de hibridoma según la reivindicación 9 para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo según la reivindicación 8.

10 21.- Un método in vitro para identificar un ligando capaz de inducir la activación de NF- κ B mediada por NIK en una célula, que comprende introducir el anticuerpo o el fragmento de este anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una célula, incubar la célula con ligandos individuales, controlar la activación del NF- κ B, y seleccionar el ligando que ha afectado a la activación de NF- κ B mediante el bloqueo específico de la actividad NIK por dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

22.- El método de la reivindicación 21, en el que la activación de NF- κ B se determina controlando la degradación de I κ Balfa.

15 23.- El método de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las células son de tipo linfoblastoide.

24.- El método de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las células se seleccionan de células Ramos, BJAB y Jurkat.

20 25.- Un método para la purificación de una proteína de unión a NIK, que comprende poner en contacto una muestra que contiene NIK y la proteína de unión a NIK con un anticuerpo o un fragmento de este anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, coimmunoprecipitar la NIK y la proteína de unión a NIK, lavar el complejo inmunológico producido, y recuperar la proteína de unión a NIK del complejo inmunológico utilizando un péptido competidor derivado de NIK.

26.- El método de la reivindicación 25, en el que la muestra se selecciona de fluidos corporales, extractos celulares, y bancos de expresión de ADN.

25 27.- El uso del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el desarrollo de un ensayo ELISA.

28.- El uso del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la purificación inmunológica de NIK o de su muteína, su derivado funcional, su fracción activa, su derivado circularmente permutado o su sal.

30

FIGURA 1

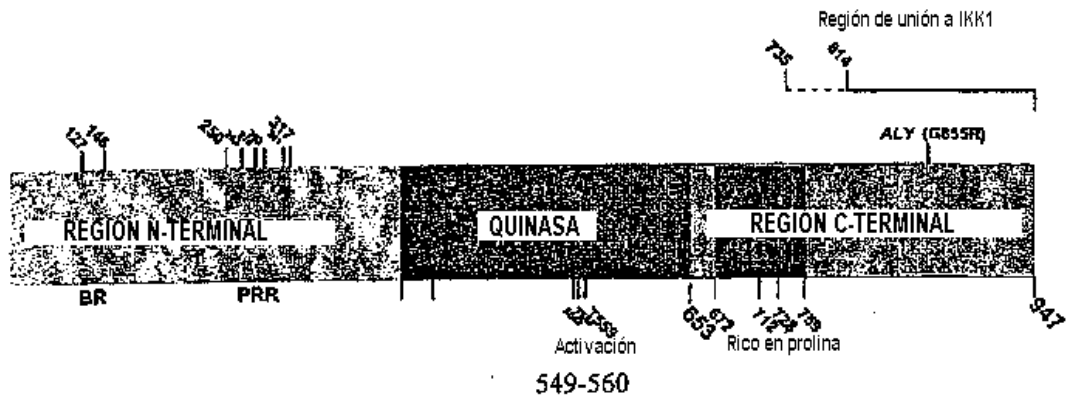


Figura 2

MEMACPG	APGSAVGQOK	ELPKPKKPTP	PLGKKQSSVY	KLEAVEKSPV	50
KWEILND	VITKGTAKEG	SEAGPAAISI	IAQAECENSQ	EFSPTFSERI	100
GSKQYSQ	SESLDQIPNN	VAHATEGKMA	RVCWKGKRRS	KARKKRKKKS	150
LAHAGVA	LAKPLPRTPE	QESCTIPVQE	DESPLGAPYV	RNTPOFTKPL	200
GLGQLCF	KQLGEGLRPA	LPRSELHKLI	SPLQCLNHVW	KLHHPQDGGP	250
PTHFPFY	SRLPHPFPPH	PLQPWKPHPL	ESFLGKLACV	DSQKPLDPH	300
LACVDSP	KPLPGPHLEP	SCLSRGAHEK	FSVEEYLVHA	LQGSVSSSQ	350
TSLAKTW	AARGSRREP	SPKTEDNEGV	LLTEKLPVD	YEYREEVHWA	400
LRLGRGS	FGEVHRMEDK	QTGFQCAVKK	VRLEVFRAEE	LMACAGLTSP	450
PLYGAVR	EGPWVNIEME	LLEGGSLGQL	VKEQGCLPED	RALYYLGQAL	500
EYLHSRR	ILHGDKADN	VLLSSDGS	ALCDFGHAVC	LQPDGLGKSL	550
<u>DYIPGTE</u>	THMAPEVVLG	RSCDAKVDVW	SSCCMMLHML	NGCHPWTQFF	600
LCLKIAS	EPPPVEIIPP	SCAPLTAQAI	QEGLRKEPIH	RVSAEELGGK	650
ALQQVGG	LKSPWRGEYK	EPRHPPPNQA	NYHQTLLHAQP	RELSPRAPGP	700
EETTGRA	PKLQPPLPPE	PPEPNKSPPL	TLSKEESGMW	EPLPLSSLEP	750
RNPSSPE	RKATVPEQEL	QOLEIELFLN	SLSQPFSLLE	QEQLSCLSI	800
SLSDSE	KNPSKASQSS	RDTLSSGVHS	WSSQAEARSS	SWNMVLARGR	850
TPSYFNG	VKVOIQSLNG	EHLHIREFHR	VKVGDIATGI	SSQIPAAAFS	900
KDGQVPR	YDMEVPDSGI	DLQCTLAPDG	SFAWSRVVKH	GQLENRP	947

Figura 3

FGHAVCLQPDGLGK SLLTGDYI P GTE THMAPE

Figura 4

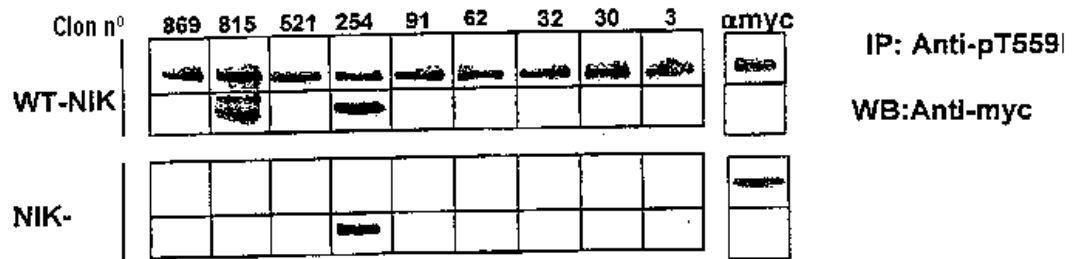


Figura 5

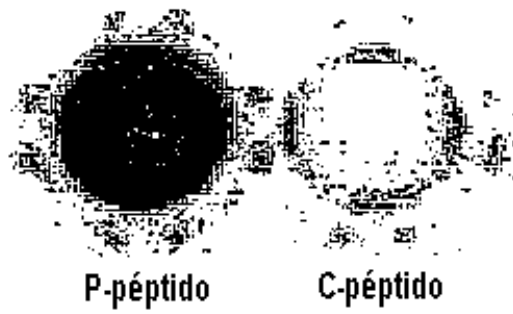
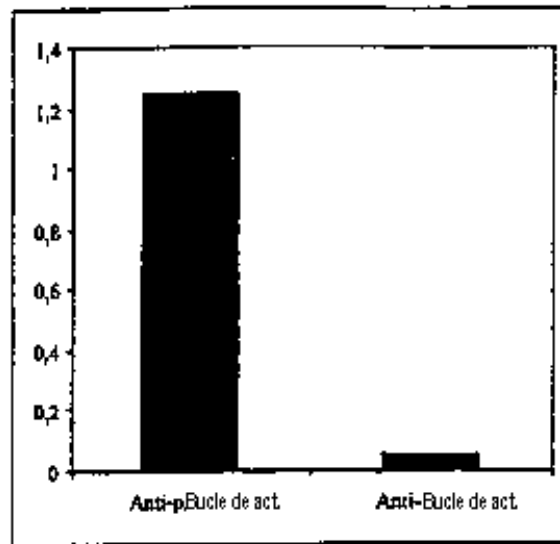


Figura 6

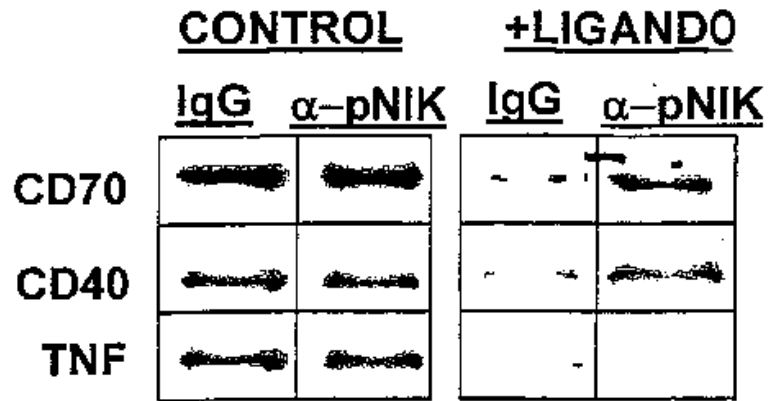


Figura 7

