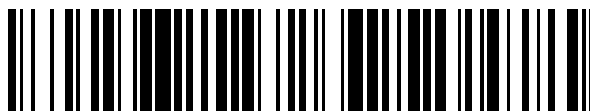


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 764**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07005603 .1**  
96 Fecha de presentación: **19.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1972637**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2008**

54 Título: **ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE huTNFR1.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.11.2011**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITÄT STUTTGART  
KEPLERSTRASSE 7  
70174 STUTTGART, DE**

72 Inventor/es:  
**Pfizenmaier, Klaus;  
Scheurich, Peter;  
Kontermann, Roland y  
Münkel, Sabine**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 368 764 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

## Antagonistas selectivos de huTNFR1

5 La presente invención está relacionada con un ligando que se une específicamente al receptor del factor de necrosis tumoral humano de tipo 1 ( huTNFR1), el ligando comprende una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaces de reducir la respuesta inmunogénica del ligando en seres humanos y una o más secuencias de aminoácidos capaces de unirse de forma selectiva a huTNFR1. La presente invención está relacionada además con un ácido nucleico que codifica dicho ligando y a una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos conectados con huTNFR1.

El TNF es una citoquina clave que regula la inflamación y la apoptosis. Dependiendo del tipo celular y el contexto ambiental, el TNF puede presentar efectos opuestos, la estimulación inmunitaria o la supresión inmunitaria, el TNF puede mediar la apoptosis así como la resistencia a la apoptosis (Locksley et al., Cell, 2001, N° 104, p. 487-501; Aggarwal B. B., Nat. Rev. Immunol., 2003, N° 3, p 745-756). En humanos, el TNF es una citoquina esencial que regula la función del sistema inmunitario innato y las respuestas inflamatorias como un todo, aunque también se ha reconocido como un mediador patogénico central de una serie de enfermedades agudas y crónicas. Específicamente, en artritis reumatoide (AR), en enfermedades intestinales inflamatorias como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, en psoriasis y en unas cuantas enfermedades raras hereditarias como el querubismo y el síndrome de fiebre periódica, asociadas con TNF y la sobreexpresión de TNFR1, respectivamente (Chatzantoni K, Mouzaki A., Curr. Top. Med. Chem., 2006, N° 6, p. 1707-1714; Ueki et al., Cell, 2007, N° 128, p. 71-83; Simon A., Van der Meer J. W., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007, N° 292, p. R86-R98), el sistema TNF se ha identificado como el mediador patológicamente relevante. En las infecciones fulminantes virales o bacterianas que conducen al denominado síndrome de la citoquina, el TNF se conoce por estar muy implicado y está bien documentado su papel crucial como mediador del choque séptico y el fallo multiorgánico. El TNF también está implicado en otras enfermedades, en particular enfermedades metabólicas que incluye la obesidad y la diabetes de tipo 2 (Hotamisligil G. S., Nature, 2006, N° 444, p. 860-867; Storz et al., FEBS Lett., 1998, N° 440, p 41-45) y algunas formas de hepatitis (Kusters et al., Eur. J. Immunol., 1997, N° 27, p. 2870-2875). Además, el TNF, a pesar de su actividad terapéutica conocida en el tratamiento local de ciertos cánceres, se considera como promotor tumoral en otras enfermedades malignas, probablemente a través de la resistencia a la apoptosis mediada por NF- $\kappa$ B y otras rutas de su pervivencia (Luo et al., Antibody engineering methods and protocols, 2004, Human Press, Towota, p. 135-159). Por lo tanto, los ensayos clínicos también exploran estrategias anti TNF como régimen terapéutico para ciertas neoplasias hematológicas (por ejemplo, AML). A partir de un punto de vista mecanicístico, se ha demostrado en numerosos modelos que incluye ratones knock-out para TNFR en los que el TNFR1 es el principal mediador de los fenotipos patológicos de TNF (Locksley et al., Cell, 2001, N° 104, p 487-501; Aggarwal et al., Nat. Rev. Immunol., 2003, N° 3, p. 745-756).

En varias enfermedades inflamatorias crónicas, los reactivos neutralizadores de TNF, específicamente los anticuerpos anti TNF y proteínas de fusión de TNFR-Fc solubles, se aplican ampliamente de forma clínica. Están aprobados tres fármacos que interfieren con la acción del TNF: Remicade (Vilcek y Feldmann, 2004) (Centocor/Tanabe), Enbrel (Immunex/Wyeth) y Humira (Celltech/Abbott). Todos los fármacos tienen como diana el TNF en sí. Los fármacos están aprobados para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), AR juvenil, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn y espondilitis anquilosante. Los fármacos que tienen como diana el TNF muestran un gran éxito frente a la AR, pero el efecto terapéutico dura solamente un breve periodo de tiempo, y a algunos pacientes son a priori refractarios al tratamiento de anticuerpos anti TNF o desarrollan resistencia. Además, la aparición de ensayos clínicos con CDP571, un anticuerpo monoclonal humanizado específico de TNF, por ejemplo, en la enfermedad de Crohn, son ciertamente menos prometedores de lo esperado, pidiendo el desarrollo de nuevos conceptos y reactivos cuya diana sea el sistema TNF/TNFR.

Además de una esperada supresión inmune general, los fármacos anti TNF aprobados muestran efectos secundarios adicionales como la producción de anticuerpos anti-dsDNA, lupus y enfermedad neuroinflamatoria. El estado inmunosuprimido de los pacientes bajo el bloqueo general de TNF está asociado con un aumento del riesgo de enfermedades infecciosas, incluyendo organismos comensales. En el "Estudio Lenercept" (1999), los ensayos clínicos de un agente anti-TNF para el tratamiento de EM tuvo que cancelarse debido a que el estado de la enfermedad empeoraba, en lugar de mejorar. El mecanismo de fondo, de esa respuesta adversa inesperada en ese momento, está ahora aclarado y está relacionado con el papel diferencial de TNFR1 y TNFR2 en esta enfermedad, con las señales de TNFR1 propagando la muerte neuronal y las señales de TNFR2 activando la regeneración de la capa de mielina. En conjunto, tal como se describe más adelante existe un aumento en las evidencias sobre las estrategias terapéuticas cuyo objetivo es que la diana selectiva sea un receptor con acción TNF que en muchas ocasiones será superior al bloqueo general de la señalización de TNF. Por ejemplo, en algunos modelos de enfermedades animales desarrolladas más adelante, los efectos contradictorios de la acción de TNF se explican mediante una función diferencial de los distintos receptores, TNFR1 y TNFR2. El conocimiento adquirido sobre los mecanismos de acción de TNF a nivel de receptor ahora sí abre nuevas estrategias con el objetivo de bloquear farmacológicamente uno de los receptores, resultando así en más efectos específicos potenciales.

Por ejemplo, la isquemia retinal es una complicación de la diabetes cuando las neuronas retinales sufren una apoptosis inducida por TNF que provoca ceguera. Las retinas de los ratones knockout para TNFR2 muestran un aumento de la apoptosis, pero las retinas de los ratones knockout para TNFR1 muestran un descenso de la apoptosis en comparación con las de tipo salvaje (Fontaine et al., J. Neurosci., 2002, N° 22, RC216).

5 De forma similar, EAE es un modelo animal de esclerosis múltiple (EM). Se caracteriza por una inflamación inicial autoinmune dirigida contra la mielina. La reacción específica de mielina desaparece después pero aparecen otros epítopos como antígenos autoinmunes. Mientras que los ratones knockout para TNF muestran una reacción inflamatoria inicial más débil hacia la mielina, la reacción inmune específica de mielina no desaparece. En ratones knockout para TNFR1, la reacción inflamatoria inicial está reducida igualmente, pero no desaparece, lo que indica que el TNFR2 es suficiente para mediar la función inmunosupresora a largo plazo de TNF, mientras que la reacción inflamatoria está mediada por TNFR1 (Kassiotis G., Kollias G., J. Exp. Med., 2001, N° 193, p. 427-434; Kollias et al., Curr. Dir. Autoimmun., 2002, N° 5, p. 30 to 50; Owens et al., Nat. Med., 2001, N° 7, p. 161-166).

15 De forma similar, en un modelo de retención de toxina (cuprizona) indujo, desmielinización reversible del SNC, pareciéndose a las fases de desmielinización/regeneración de la esclerosis múltiple (EM), habiendo evidencias de que el proceso de remielinización tras la retirada de la toxina depende de TNF y requiere de forma selectiva la señalización de TNFR2, disipando la expansión de progenitor de oligodendrocitos y la diferenciación de oligodendrocitos en láminas de mielina maduras (Arnett et al., Nat. Neurosci., 2001, N° 4, p. 1116-1122). Esto hallazgos de la dependencia de TNF en la degeneración de oligodendrocitos refleja la situación de humanos que padecen EM: En ensayos clínicos cuyo objetivo es un bloqueo completo de TNF en EM con una proteína de fusión de TNFR1-Fc, el bloqueo de TNF se asoció con un agravamiento de la enfermedad en lugar de un beneficio terapéutico, lo cual está de acuerdo con los resultados del modelo animal descrito anteriormente.

25 Además, por ejemplo las neuronas corticales de los ratones sucumben a la muerte excitotóxica tras la evidente activación del receptor NMDA mediante el neurotransmisor glutamato. El glutamato se libera desde el tejido moribundo tras condiciones isquémicas (falta de oxígeno) como ocurre en las apoplejías. Los cultivos primarios de neuronas pueden resultar en completamente resistentes a la excitotoxicidad de una manera dependiente de TNFR2 involucrando a la ruta PI3K - AKT - NF-κB. Por el contrario, las señales de TNFR1 aumentan la muerte celular inducida por glutamato (Marchetti et al., J. Biol. Chem., 2004, N° 279, p. 32869-32881), lo que indica un papel diferencial de TNFR1 y TNFR2 en el SNC.

35 Por lo tanto, en varios modelos de neurodegeneración aguda y crónica, isquemia retinal, modelos de apoplejía y en esclerosis múltiple, un bloqueo completo de TNF no presenta efectos terapéuticos aparentes pero en su lugar es directamente perjudicial o reduce la capacidad regenerativa del tejido afectado. De acuerdo con esto, el bloqueo específico de TNFR1, el TNFR inflamatorio, y el mantenimiento de la función de TNFR2, presenta una aproximación terapéutica prometedora para estas enfermedades.

40 De forma similar, tanto en artritis reumatoide (AR), como en la psoriasis y en otras enfermedades más raras y hereditarias como el querubismo y el síndrome de fiebre periódica, asociados con la sobreexpresión de TNFR y TNFR1, respectivamente, el TNFR1 se considera o se ha identificado claramente como el receptor patológicamente relevante. Un papel diferencial de TNFR1 y 2 parece también ser evidente en la enfermedad de Crohn, en la que solo una fracción de los pacientes responde a una terapia contra el TNF, y en LES (Komata et al., Tissue Antigens, 1999, N° 53, p. 527-533), con resistencia al tratamiento y susceptibilidad por la enfermedad, respectivamente, correlacionándose ambos con mutaciones del TNFR2.

45 De acuerdo con esto, si se utiliza un anticuerpo selectivo del receptor dirigido contra TNFR1 representa una alternativa para establecer estrategias anti TNF en estas enfermedades inflamatorias crónicas. Esto es de particular relevancia en pacientes que pasan a ser resistentes a reactivos anti TNF tras los ciclos de tratamiento repetitivos. Además, el bloqueo global y continuado del TNF está asociado con una deficiencia funcional en la respuesta inmune innata y adaptativa, el riesgo de complicaciones debido a enfermedades infecciosas aumenta de forma considerable en estos pacientes. La interferencia selectiva con TNFR1 mantiene las respuestas de TNF mediante TNFR2, que será beneficiosa para la competencia inmune general de los pacientes.

55 El apoyo a un bloqueo selectivo de TNFR1 como régimen terapéutico poderoso aparece en estudios previos de los inventores de la función in vitro y in vivo del anticuerpo monoclonal antagonista (mAb) H398 de ratón específico para TNFR1 humano (Thoma et al., J. Exp. Med., 1990, N° 172, p. 1019-1023; Grell et al., Cell, 1995, N° 83, p. 793-802; Moosmayer et al., Ther. Immunol., 1995, N° 2, p. 31-40). Este anticuerpo murino y sus derivados recombinantes scFv de ratón son capaces de neutralizar un amplio espectro de actividades de TNF in vitro a través de la inhibición competitiva de la unión de TNF a TNFR1 humano; el mAb mostró ser efectivo en la prevención de síndrome de choque letal inducido por bacterias en babuinos, en el que H398 muestra reactividad cruzada con el TNFR1 de esta especie. La eficacia terapéutica del anticuerpo H398 en enfermedades crónicas dependientes de TNF, no puede evaluarse en ensayos clínicos debido al origen murino del anticuerpo, ya que es portador de riesgo de reacciones adversas graves hacia el anticuerpo de ratón y/o el rápido desarrollo de una respuesta inmune tras los ciclos de tratamiento repetitivos.

Por lo tanto, existe una necesidad para nuevas sustancias que interactúen de forma efectiva y específica con TNFR1 humano (huTNFR1) como antagonistas de TNF en un paciente y que tengan una respuesta inmunogénica reducida (es decir, tolerable) tras la administración a seres humanos.

5 Así, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar nuevos ligandos de huTNFR1 de baja inmunogenicidad como antagonistas de la acción de TNF adecuados para la aplicación en seres humanos como una terapia para el tratamiento de una serie de trastornos mediados por TNF.

10 De acuerdo con la presente invención, el problema anterior se resuelve proporcionando un ligando de huTNFR1 que comprende una construcción proteínica que posee (i) una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaz de reducir la respuesta inmunogénica de dicho ligando de huTNFR1 en humanos, y (ii) una o más secuencias de aminoácidos de origen no humano capaces de unirse de forma selectiva a huTNFR1, en el que la construcción proteínica comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 7 como dominio variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 8 como dominio variable de la cadena ligera (VL), o un fragmento de un anticuerpo humanizado, siendo el fragmento un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 9.

20 En este documento, el término "ligando de huTNFR1" significa cualquier molécula o grupo de moléculas que pueden unirse de forma selectiva al receptor de TNF humano de tipo 1 (huTNFR1) y al mismo tiempo muestra una respuesta inmunogénica reducida cuando se administra a un ser humano. Al unirse a huTNFR1, dicho ligando de huTNFR1 actúa como un antagonista de TNF y de linfotóxina alfa (LT $\alpha$ ) que son ligandos naturales entre otros de TNFR1.

25 El término "huTNFR1" utilizado en este documento no solo está relacionado con el receptor de TNF humano de tipo 1 como tal, sino que también incluye cualquier porción de mismo, o cualquier otro receptor que está estructuralmente y/o funcionalmente relacionado con huTNFR1.

30 La expresión "respuesta inmunogénica reducida" indica una respuesta inmunogénica que es reducida en comparación con la respuesta inmunogénica de un ligando de huTNFR1 que comprende exclusivamente secuencias de aminoácidos de origen no humano. Ejemplos de ligandos de huTNFR1 que comprenden exclusivamente secuencias de aminoácidos de origen no humano incluye péptidos, proteínas y ácidos nucleicos de origen mamífero no humano, como de origen de roedores, por ejemplo un anticuerpo murino.

35 La expresión "construcción proteínica" utilizada en este documento no está específicamente restringida y significa cualquier molécula o grupo de moléculas que contienen uno o más enlaces peptídicos, preferiblemente secuencias de péptidos, y se une a huTNFR1 mientras muestra una respuesta inmunogénica reducida en seres humanos. La construcción proteínica de acuerdo con la presente invención puede comprender además ácidos nucleicos y compuestos orgánicos e inorgánicos, como azúcares o ácidos grasos. Además, la construcción proteínica puede comprender un grupo de moléculas que están asociadas independientemente mediante enlaces covalentes o no covalentes, como proteínas de fusión. De acuerdo con otra realización de la presente invención, la construcción proteínica puede además acoplarse con moléculas adicionales, por ejemplo polietilenglicol o metoxi-polietilenglicol, es decir, puede estar PEGilado.

45 El ligando de huTNFR1 y/o la construcción proteínica de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, como por ejemplo mediante métodos recombinantes que implican la construcción de un plásmido adecuado o vector y la expresión en un microorganismo o en cualquier organismo superior, o mediante la síntesis de péptidos automatizada, como la síntesis de péptidos en fase sólida.

50 La expresión "secuencias de aminoácidos de origen humano" utilizada en este documento se refiere a las secuencias de aminoácidos que pueden encontrarse en el cuerpo humano. No obstante, la expresión no está restringida únicamente a tales secuencias de aminoácidos que pueden encontrarse exactamente en el cuerpo humano pero también incluye aquellas secuencias de aminoácidos que poseen una similitud del 50% o más con las secuencias de aminoácidos humanos. Los ejemplos específicos de las secuencias de aminoácidos de origen humano son las secuencias de aminoácidos contenidas en un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

60 Además, la expresión "secuencias de aminoácidos de origen no humano" utilizada en este documento se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos, que puede encontrarse en un animal no humano, como un mamífero distinto a un ser humano. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de origen no humano puede ser secuencia de un anticuerpo no humano, por ejemplo un anticuerpo murino.

65 En la construcción proteínica de la presente invención las ventajas de las secuencias de aminoácidos de origen humano, que reducen el riesgo de por ejemplo, inmunogenicidad en un paciente, se combina con la selectividad hacia huTNFR1 de secuencias de aminoácidos de origen no humano, como por ejemplo aquellas encontradas en el anticuerpo murino H398.

En el ligando de huTNFR1 tal como se ha definido anteriormente, la construcción proteínica puede comprender entre otros un fragmento de un anticuerpo humanizado, pudiendo ser un fragmento ScFv que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. Nº: 9.

5 El término "anticuerpo" utilizado en este documento se refiere a cualquier clase de anticuerpo que pueda unirse a un antígeno, lo que incluye a los anticuerpos naturales, anticuerpos mutados y anticuerpos (semi)-sintéticos, siempre que el anticuerpo permita una administración a un ser humano con una respuesta inmunogénica reducida al mismo. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o obtenible mediante por ejemplo, tecnología de ácidos nucleicos recombinantes ("anticuerpo recombinante humanizado") o al menos un fragmento del mismo o una proteína recombinante similar a un anticuerpo. Como ejemplo, sin limitarse a este, un fragmento puede estar contenido en un anticuerpo como proteína recombinante como los diacuerpos, proteínas de fusión de scFv-Fc, y proteínas de fusión de scFv-CH3.

15 El anticuerpo, o al menos un fragmento del mismo, o una proteína recombinante similar a un anticuerpo, puede contener una o más mutaciones o variaciones, como aminoácidos o ácidos nucleicos añadidos, delecionados o sustituidos, siempre que no tengan un efecto negativo sobre la interacción con huTNFR1. Además, el anticuerpo o al menos un fragmento del mismo, o una proteína recombinante similar a un anticuerpo, puede contener una o más mutaciones o variaciones, como aminoácidos o ácidos nucleicos añadidos, delecionados o sustituidos, que poseen un efecto positivo sobre la interacción de huTNFR1 y que mejora la actividad antagonista de dicha molécula. En particular, dichas variantes mutadas poseen una mejor afinidad y/o una mejor actividad inhibidora.

25 En general, el término "fragmento" se refiere a cualquier porción de un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente siempre que posea la capacidad de unirse al antígeno deseado a través de un antígeno (monovalente) o dos antígenos (bivalente) a sitios de unión (huTNFR1). Además, un fragmento generalmente puede comprender varias porciones diferentes de dicho anticuerpo. Ejemplos de fragmentos monovalentes de un anticuerpo producido de forma proteolítica o recombinante incluye fragmento de unión a antígeno (Fab), fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmento variable (Fv), Fv estabilizado con puentes disulfuro (dsFv), cadena pesada del dominio variable de la inmunoglobulina (VH), cadena ligera del dominio variable de la inmunoglobulina (VL), regiones determinadas de la complementariedad (CDR), y combinaciones de las mismas. Ejemplos de fragmentos bivalentes procesados de forma proteolítica o recombinante de la presente invención incluye diacuerpos F(ab)<sub>2</sub>, proteínas de fusión de scFv-Fc, y proteínas de fusión de scFv-CH3.

35 Por ejemplo, el anticuerpo o al menos un fragmento del mismo puede ser un anticuerpo humanizado o al menos un fragmento del mismo derivado del anticuerpo murino H398.

40 No existe limitación a la técnica de humanización del anticuerpo, siempre que el anticuerpo se una al antígeno deseado. Ejemplos de humanización incluye, pero sin limitarse a, injerto de regiones determinantes de la complementariedad (injerto de CDR) (Jones et al. 1986, Nature 321, 522-525), injerto de residuos determinantes de la especificidad (injerto de SDR) (Kashmiri et al., 2005, Methods 36, 25-34), reestructuración de dominios variables (Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973), selección basada en la estructura y humanización mediante injertos de CDR (Hwang et al., 2005, Methods 36, 35-42), y estrategias de desinmunización (Hellendorn et al., 2004, Cancer Cell International 4 (Suppl. 1), 20).

45 La expresión "anticuerpo humanizado" utilizado en este documento se refiere a cualquier anticuerpo en que se utiliza el diseño de proteínas para reducir la cantidad de secuencia proteica extraña ("no humana") mediante intercambio por ejemplo, de regiones constantes de anticuerpo de roedores y/o estructuras de dominios variables o residuos estructurales con secuencias que se encuentran en anticuerpos humanos.

50 En una realización específica de la presente invención, la construcción proteínica del ligando de huTNFR1 anteriormente definido puede ser un anticuerpo humanizado, que contiene secuencias de aminoácidos de origen humano y la de origen no humano, es de roedores.

55 El término "scFv" utilizado en este documento indica una fusión de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de cualquier inmunoglobulina, unidas mediante un enlazante, como por ejemplo un péptido compuesto por serina, glicina, o cualquier otro aminoácido natural o no natural.

60 En general el fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste en una región Fab, un scFv, un derivado recombinante genéticamente diseñado o procesado posttraduccionalmente de dichos fragmentos, y un derivado químicamente modificado de dichos fragmentos.

Tal como ya se ha definido anteriormente, el fragmento es un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. Nº: 9.

65 En el ligando anteriormente definido, la construcción proteínica comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Id. de Sec. Nº: 1 a 6, que confieren la unión a huTNFR1, en el que dichos CDR están contenidos preferiblemente en una o más secuencias de aminoácidos de origen no humano capaces unirse de forma

selectiva a huTNFR1 tal como se ha descrito en (ii) de la construcción proteínica anterior.

Tal como se ha definido anteriormente, la construcción proteínica puede comprender entre otros la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 7 como dominio variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 8 como dominio variable de la cadena ligera (VL).

En aún otra realización de la presente invención, el ligando anteriormente definido de huTNFR1 comprende una cola adicional que permite la interacción específica con un compuesto biológicamente aceptable. No existe una limitación específica respecto a la cola utilizable en la presente invención, siempre que no tenga un impacto negativo o que sea tolerable en la unión del ligando de huTNFR1 a huTNFR1 o en la respuesta inmunogénica cuando se administre a un ser humano. Ejemplos de colas adecuadas incluye cola de His, cola de Myc, cola de FLAG, cola de Strep, cola de Calmodulina, cola de GST, cola de MBP, y cola de S.

En otra realización del ligando de huTNFR1 como se ha definido anteriormente, la construcción proteínica comprende además un compuesto biológicamente aceptable unido de forma no covalente al mismo o unido de forma covalente al mismo o mediante conjugación química posttransduccional o mediante tecnología de genes recombinantes.

La expresión "compuesto biológicamente aceptable" utilizado en este documento no se restringe de forma específica y se refiere a cualquier compuesto utilizable en un ambiente biológico, como en un organismo vivo, lo que incluye también la acetación farmacéutica de dicho compuesto biológicamente aceptable. Ejemplos de compuesto biológicamente aceptables de acuerdo con la presente invención son, sin ninguna limitación a los mismos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, así como otros compuestos orgánicos e inorgánicos. El compuesto biológicamente aceptable preferiblemente ejerce efectos positivos adicionales, por ejemplo propiedades bioquímicas/biofísicas mejoradas, como solubilidad aumentada, estabilidad prolongada, actividad antigénica mejorada, y propiedades farmacocinéticas mejoradas, como aumento de la vida media in vivo, aumento de la penetración en tejidos, traspaso de la barrera hematoencefálica y toxicidad reducida.

De acuerdo con una realización específica con el objetivo de mejorar las propiedades farmacocinéticas del ligando de huTNFR1 anteriormente definido, el compuesto biológicamente aceptable se selecciona a partir del grupo que consiste en proteínas séricas.

En otra realización del ligando de huTNFR1 tal como se ha definido anteriormente, el compuesto biológicamente aceptable es albúmina. De acuerdo con una realización específica, el compuesto biológicamente aceptable es albúmina sérica humana (HSA).

En otra realización del ligando de huTNFR1 tal como se ha definido anteriormente, el compuesto biológicamente aceptable comprende un dominio de unión a albúmina (por ejemplo, de bacterias), un péptido de unión a albúmina compuesto de aminoácidos naturales o no naturales, una o más cadenas acilo con actividad de unión a albúmina, polietilenglicol o metoxi-polietilenglicol. En aún otra realización del ligando de huTNFR1 definido anteriormente, el compuesto biológicamente aceptable comprende otro anticuerpo o fragmento del mismo específico para un componente de proteína sérica o un ligando natural o sintético, que se une a un componente sérico (por ejemplo, albúmina).

En otra realización específica cuyo objetivo es mejorar las propiedades farmacocinéticas del ligando de huTNFR1 definido anteriormente, el compuesto biológicamente aceptable comprende otro anticuerpo dirigido contra una molécula de la superficie celular o componente de la matriz extracelular. Como ejemplo, se han utilizado anticuerpos anti-HIR (receptor de Insulina humana) o anti-TR (receptor de la transferrina) para el transporte activo mediante la barrera hematocéfálica y la liberación de compuestos en el cerebro (Boado et al., 2007, Bioc. conjug. Chem., publicación electrónica antes que la escrita).

En otra realización específica cuyo objetivo es mejorar la actividad funcional del ligando de huTNFR1 definido anteriormente, el compuesto biológicamente aceptable comprende un anticuerpo que se une a otro epítipo de TNFR1, diferente del reconocido por el ligando de huTNFR1 definido anteriormente, aumentando de esta manera la unión general (avidéz) y selectividad de este reactivo específico.

De acuerdo con otra realización específica del ligando de huTNFR1 como se ha definido anteriormente, la construcción proteínica comprende una proteína de fusión de acuerdo con Id. de Sec. N°: 10.

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a un ácido nucleico que codifica un ligando de huTNFR1 definido anteriormente.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no está restringido específicamente y puede contener DNA o RNA. El ácido nucleico puede comprender además secuencias que se utilizan en procesos de detección o aislamiento, como por ejemplo marcadores fluorescentes o colas de His. El ácido nucleico puede comprender además bloques de construcción artificiales como bloques de construcción artificiales de DNA, RNA o PNA. Además, el ácido

nucleico de acuerdo con la presente invención puede producirse de cualquier forma adecuada, como de forma recombinante o mediante síntesis química, como síntesis en fase sólida.

5 Otro aspecto de la presente invención está relacionada con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico como se ha definido anteriormente. El vector de la presente invención no está restringido específicamente siempre que pueda utilizarse en la transfección de una célula huésped adecuada y sea adecuada para la expresión génica heteróloga.

10 Los métodos utilizados para construir vectores son bien conocidos por un experto en la materia y se describen en varias publicaciones. En particular, las técnicas para construir vectores adecuados, lo que incluye una descripción de los componentes funcionales como promotores, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación, marcadores de selección, orígenes de replicación, señales de corte y empalme, y secuencia líder, se revisan con considerable detalle en (Sambrook et al., 1989) y en las referencias citadas en esta publicación. Los vectores pueden incluir, sin ninguna limitación, vectores plasmídicos, fagémidos, cósmidos, artificial/minicromosomas (por ejemplo, ACE), vectores MAR, o vectores virales como baculovirus, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus herpes simplex, retrovirus, bacteriófagos. Ejemplos de vectores adecuados para la expresión procariota incluye pAB1 (Kontermann et al., 1997). Los vectores de expresión eucariota contendrán normalmente también secuencias procariotas que facilitan la propagación del vector en bacterias como un origen de replicación y genes de resistencia a antibióticos para la selección en bacterias. Una serie de vectores de expresión eucariota, que contienen sitios de clonación en uno o más polinucleótidos puede unirse de forma operativa, son bien conocidos en la materia y algunos están disponibles comercialmente por compañías como Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA; Lonza Biologics PLC, Slough, Berkshire, Inglaterra. Ejemplos de vectores eucariotas son pCDNA3, pSecTag, y pEE 6.4.

25 En una realización preferible, el vector de expresión comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que es una secuencia reguladora necesaria para la transcripción y traducción de secuencias de nucleótidos que codifican un péptido/ polipéptido/ proteína de interés.

30 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con una célula huésped que contiene el ácido nucleico anteriormente definido o el vector anteriormente definido. La célula huésped de la presente invención no está específicamente restringida e incluye todas las células que pueden utilizarse en la producción del ligando de huTNFR1 y/o la construcción proteica o partes de la misma. Ejemplos de células huésped adecuadas para la presente invención incluyen las células procariotas y células eucariotas, como levaduras, células vegetales, células de insecto y células de mamífero con o rigen de diferentes especies y organismos completos no humanos transgénicos (plantas transgénicas, animales no humanos transgénicos). Ejemplos de células procariotas incluyen a E. coli, TG1 y especies de Pseudomonas. Ejemplos de células animales incluyen las células de hámster, preferiblemente las células BHK21, BHK TK-, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 y CHODG44, o derivadas/ progenie de cualquiera de tales líneas celulares. En otra realización de la presente invención, las células huésped son células de mieloma murino, preferiblemente células NSO y Sp2/0 o derivadas/ progenie de cualquiera de tales líneas celulares. Ejemplos de células de mamífero que pueden utilizarse para la expresión de ligandos de huTNFR1 de acuerdo con la presente invención se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1: Líneas celulares de producción eucariotas

45	LÍNEA CELULAR	NÚMERO DE ORDEN
	NS0 ECACC	Nº 85110503
	Sp2/0-Ag14 AT	CC CRL-1581
	BHK21 AT	CC CCL-10
	BHK TK- ECACC	Nº 85011423
50	HaK AT	CC CCL-15
	2254-62.2 (derivada de BHK-21)	ATCC CRL-8544
	CHO ECACC	Nº 8505302
	CHO salvaje ECACC	00102307
	CHO-K1 AT	CCCCL-61
55	CHO-DUKX(= CHO duk-, CHO/dhfr-)	ATCCCRL-9096
	CHO-DUKX B11 AT	CC CRL-9010
	CHO-DG44	(Urlaub et al., 1983)
	CHO Pro-5 AT	CC CRL-1781
	V79 AT	CC CCC-93
60	B14AF28-G3 AT	CC CCL-14
	HEK 293 AT	CC CRL-1573
	COS-7 AT	CC CRL-1651
	U266 AT	CC TIB-196
	HuNS1 AT	CC CRL-8644
65	CHL ECACC	Nº 87111906

Las células huésped que se han establecido, adaptado y cultivado completamente bajo condiciones libres de suero son más preferibles, y opcionalmente en medios que estén libres de cualquier proteína/ péptido de origen animal. Los medios disponibles a nivel comercial, como el F12 de Ham (Sigma, Deisenhofen, Alemania), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), CHO-S-Invitrogen), medio CHO libre de suero (Sigma) y el medio CHO libre de proteínas (Sigma) son ejemplos de soluciones de nutrientes apropiadas. Cualquiera de los medios puede suplementarse según las necesidades con una gran variedad de compuestos, ejemplos de los cuales serían las hormonas y/o otros factores de crecimiento (como la insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento parecido a la insulina), sales (como el cloruro sódico, calcio, magnesio, fosfato), taponnes (como el HEPES), nucleósidos (como la adenosina y la timidina), glutamina, glucosa u otras fuentes de energía equivalentes, antibióticos y elementos traza. Puede incluirse cualquier otro suplemento necesario conocido por los expertos en la materia a concentraciones apropiadas. En la presente invención, la utilización de medio libre de suero es preferible, pero también pueden utilizarse para el cultivo de células huésped medios suplementados con una cantidad adecuada de suero. Para la obtención y selección de células modificadas genéticamente que expresan el gen seleccionable, se añade un agente de selección adecuado al medio de cultivo.

Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva a nivel terapéutico del ligando de huTNFR1 como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente uno o más componentes adicionales seleccionados de entre el grupo que consiste en un transportador aceptable a nivel farmacéutico, sales aceptables a nivel farmacéutico, un agente auxiliar, un estabilizante, un diluyente y un solvente, o cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica que se ha definido anteriormente, puede utilizarse para el tratamiento de la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunes, infecciones virales o bacterianas agudas fulminantes, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, preferiblemente seleccionadas de entre esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y Alzheimer, y enfermedades genéticas hereditarias en las que TNF/TNFR1 es el mediador causante de la patología, preferiblemente seleccionadas de entre el síndrome de la fiebre periódica, el querubismo y el cáncer.

El ligando de huTNFR1 de la presente invención también puede utilizarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquier trastorno relacionado con el TNF, como los mencionados anteriormente.

También se proporciona un método para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad seleccionada de entre artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunes, infecciones virales o bacterianas agudas fulminantes, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, preferiblemente seleccionadas de entre esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y Alzheimer, y enfermedades genéticas hereditarias en las que TNF/TNFR1 es el mediador causante de la patología, preferiblemente seleccionadas de entre el síndrome de la fiebre periódica, el querubismo y el cáncer, lo que comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del ligando de huTNFR1 definido anteriormente a un paciente con necesidad del mismo.

De acuerdo con la presente invención, el ligando de huTNFR1 como se ha descrito anteriormente puede utilizarse para el procedimiento de selección guiada de acuerdo con el estado de la materia (Jespers et al., 1994, Biotechnology) para el aislamiento de un anticuerpo específico contra huTNFR1 funcionalmente equivalente a partir de bibliotecas génicas de inmunoglobulinas humanas, minimizando así además la potencial inmunogenicidad de dicho reactivo.

Además, se proporciona un proceso para la producción de un ligando de huTNFR1 con una respuesta inmunogénica reducida cuando se administra a un ser humano, que comprende los pasos de (a) proporcionar una construcción proteica como la que se ha definido anteriormente, (b) identificar una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaces de unirse selectivamente a huTNFR1 mediante selección guiada, utilizando como molde una o más de las secuencias de aminoácidos de dicha construcción de proteínas, en particular las secuencias de aminoácidos de origen no humano, y (c) generar la construcción de dicho ligando que comprende al menos una o más de las secuencias de aminoácidos identificadas en el paso (b).

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con la utilización de un ligando de huTNFR1 que comprende una construcción de proteínas con (i) una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaces de reducir la respuesta inmunogénica de dicho ligando de huTNFR1 en humanos, y (ii) una o más secuencias de aminoácidos de origen no humano capaces de unirse selectivamente a huTNFR1, como molde para la selección guiada en la identificación y construcción de otro ligando de huTNFR1 de baja inmunogenicidad que comprende las secuencias de aminoácidos que son esencialmente o únicamente de origen humano.



Las figuras muestran:

La Fig. 1 muestra el alineamiento de las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal murino H398, las secuencias más cercanas a las del VH de línea germinal humana (VH1-69 = 1-e = DP-88) y VL (A3 = DPK15), así como las secuencias VH y VL humanizadas (IZI-06.1 VH, IZI-06.1 VL) generadas mediante injerto de CDR. Los aminoácidos que difieren entre el H398 y las secuencias de línea germinal humanas están marcados con asteriscos. Las regiones marco (FR) y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están indicadas.

La Fig. 2 muestra las secuencias de DNA de IZI-06.1 VH y IZI-06.1 VL con codones optimizados (carril superior) y los correspondientes aminoácidos (carril inferior); los caracteres en cursiva al inicio y al final de cada secuencia de aminoácidos no pertenecen a IZI-06.1 VH e IZI-06.1 VL y están relacionados con las secuencias de aminoácidos utilizadas para el clonaje/ procesamiento y contienen las dianas de escisión para ciertas enzimas de restricción.

La Fig. 3 muestra las estructuras modelo superpuestas del armazón de H398 Fv (gris claro) e IZI-06.1 Fv (gris oscuro). a) vista lateral de las dos estructuras modelo. b) vista superior de las regiones CDR H1-H3 y L1-L3. Los modelos se generaron con WAM (Whitelegg y Rees, 2000; WAM - un algoritmo mejorado para realizar modelos de anticuerpos en la red. Prot. Eng. 13, 819-824). Las estructuras se visualizaron con Pymol (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA).

La Fig. 4 muestra una estrategia de clonaje para generar un vector bacteriano para la expresión de fragmentos Fab.

La Fig. 5a muestra un Western Blot sobre nitrocelulosa tras un SDS-PAGE utilizando un gel no reductor al 12% tras la preparación del IMAC (1). Detección mediante un anti-Fab humano - AP; tinción de AP de acuerdo con los procedimientos estándar; se aplicaron 15  $\mu$ L de muestra en el gel. Abreviaturas: PP = extracto de periplasma, DL = flujo a través del IMAC, W = fracción de lavado, F = fracción.

La Fig. 5b muestra una tinción de Coomassie de una purificación con IMAC (1) tras un SDS-PAGE en un gel al 12%. La parte izquierda del marcador representa un gel no reductor y la parte derecha, un gel bajo condiciones reductoras. El volumen de muestra fue de 15  $\mu$ L.

La Fig. 6 muestra una curva de saturación de la unión y la representación de Scatchard derivada de la unión del IZI-06.1-Fab a las células positivas para el receptor. Se ha sustraído la unión no específica. Los datos resultantes muestran que la unión de IZI-06.1-Fab a TNFR1-Fas es saturable y específica, con una afinidad aparente de  $K_D = 0,778$  nM.

La Fig. 7 muestra los análisis de citometría de flujo de fibroblastos embrionarios murinos que expresan de forma estable receptores quiméricos que están comprendidos por el dominio extracelular (ED) del TNFR1 y el dominio citoplasmático del receptor de muerte Fas, TNFR1-Fas (A) o receptores quiméricos comprendidos por TNFR2-ED y Fas (TNFR2-Fas) (B), o receptores quiméricos con una delección del dominio rico en cisteína (CRD) 1 del TNFR1,  $\Delta$ CRD1-TNFR1-Fas (C y D) o un mutante de intercambio de CRD1, comprendidos por una molécula de TNFR1-Fas que contiene la CRD1 de TNFR2, CRD1<sup>TNFR2</sup>-TNFR1-Fas (E y F). Estos transfectantes se incubaron en hielo durante dos horas con 2.5  $\mu$ g/ml de IZI-06.1-Fab (A - C, E, histogramas blancos), el anticuerpo específico de TNFR1 mAb225 (D y F, histogramas blancos), el anticuerpo específico de TNFR2 80M2 (B, histograma blanco+negrita) o que sólo se trataron con anticuerpos secundarios como control (histogramas grises). El tampón de incubación fue PBA (PBS + albúmina sérica bovina al 0,05% + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 0,2%). Las células se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con FITC (80M2 y mAb225: de cabra anti-IgG murina; IZI-06.1 Fab: de cabra anti-cola de HIS) y las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se visualizaron las células viables y se proporciona la intensidad total de fluorescencia (MnX) para cada anticuerpo. (Con = valores control).

La Fig. 8 muestra diagramas relacionados con la inhibición del TNFR1 por IZI-06.1. Las células Kym1 se sembraron un día antes del tratamiento en una placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo en RPMI 1640 + FCS al 5%). Al día siguiente las células se trataron con 100 ng/ml de huTNF en tres pasos de dilución. El control fue la titulación de PBS. Tras 16 horas, las células se analizaron mediante un ensayo de violeta cristal. La absorbancia de DO se midió a 550 nm. Los resultados se muestran como un porcentaje del control (células tratadas con PBS). Panel superior: 1,25 ng/ml de huTNF se estimó como una dosis suficiente para inducir la toxicidad máxima. Panel inferior: Una cantidad constante de 1,25 ng/ml de huTNF se aplicó tras una preincubación de 60 min con 25  $\mu$ g/ml de H398, H398-Fab o H398-Fab humanizado, todos diluidos en tres pasos. Tras 16 horas, las células se analizaron mediante el ensayo de violeta cristal. Se midió la absorbancia de DO a 550 nm. Los resultados se muestran como porcentaje del control.

La Fig. 9 muestra la composición de la scFv IZI-06.1 en la configuración VH-VL (a) y VL-VH (b) así como una proteína de fusión scFv-albúmina (c). Todas las construcciones contienen una secuencia líder N-terminal para la expresión soluble así como una cola de hexahistidilo (His6) y en el caso de las moléculas scFv también una cola de myc. Las secuencias de unión se muestran como barras negras.

El ligando de huTNFR1 de acuerdo con la presente invención se une al TNFR1 humano con elevada especificidad, interaccionando con la CRD1 de su receptor. De forma inesperada, el ligando de huTNFR1 se une al TNFR1 con una afinidad muy elevada, que de forma ventajosa supera la del anticuerpo murino H398. Por lo tanto, el ligando del TNFR1 humano que se ha descrito anteriormente evita de forma muy eficiente la acción y bioactividad de los ligandos que aparecen en la naturaleza de TNFR1, TNF y  $LT\alpha$  y es superior en su actividad antagonística al anticuerpo H398 murino descrito previamente en la materia. Debido al contenido de secuencias de aminoácidos de origen humano este ligando es de una ventajosa baja inmunogenicidad. Por lo tanto, el ligando de huTNFR1 de la presente invención permite el tratamiento de un paciente que padece un trastorno relacionado con el TNFR1 sin riesgo de reacciones adversas agudas frente al ligando y/o el rápido desarrollo de respuesta inmune, mientras al mismo tiempo se beneficia de una elevada selectividad y eficiencia de bloqueo de la secuencia de aminoácidos de origen no humano dirigidas contra el huTNFR1.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación para ésta.

#### 15 Ejemplos

Ejemplo 1: Generación *in silico* de un antagonista anti-receptor TNF1 basado en las secuencias del anticuerpo monoclonal murino H398 y secuencias génicas de Ig V de línea germinal humana

20 Las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada (VH) del H398 y del dominio variable de la cadena ligera (VL) (Moosmayer et al., Ther. Immunol., 1995, N° 2, págs. 31-40) se utilizaron para buscar segmentos V de línea germinal humana similares utilizando la base de datos base V (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) así como el IgBlast. Esta búsqueda identificó varias secuencias VH de línea germinal (DP75, DP8, DP88) con una similitud global del 61,2-62,2% y varias secuencias VL de línea germinal (DPK15, DPK13, DPK27, DPK28) con una similitud del 80,0-81,0%. Las secuencias identificadas se alinearon con las VH y VL del H398 y se identificaron los aminoácidos críticos para la conformación de las CDR, la interficie VH/VL así como la zona Vernier como se han descrito (O'Brien S., Jones T., Antibody engineering, a lab manual, Springer, 2001, págs. 567-590; Lo B. K. C., Antibody engineering, methods and protocols, Humana Press, 2004, págs. 135-159). Las regiones CDR se asignaron utilizando las definiciones de Kabat, Chothia, AbM y Contact (Martin A. C. R., Antibody engineering, a lab manual, Springer, 2001, págs. 422-439). Además, las clases canónicas de L1-L3 y H1-H2 se determinaron como las siguientes: L1-4, L2-1, L3-1, H1-1, H2-3 (Martin A. C. R., Antibody engineering, a lab manual, Springer, 2001, págs. 567-590). Para el reemplazo de las CDR, se definieron las CDR como las siguientes: aminoácidos L24-L34 (CDRL1), L46-L56 (CDRL2), L89-L97 (CDRL3), H26-H35 (CDRH1), H47-H65 (CDRH3) y H95-H102 (CDRH33). Como secuencias receptoras humanas, se eligió el segmento de VH de línea germinal VH1-69 (1-e, DP88) y el segmento de VL de línea germinal A3 (DPK15). Las seis CDR se insertaron en estos segmentos de línea germinal variables humanos (Fig. 1). Las secuencias únicas resultantes se denominaron IZI-06.1 VH (Id. de Sec. N° 7) y IZI-06.1 VL (Id. de Sec. N° 8), respectivamente.

Ejemplo 2: Síntesis de la secuencia de DNA de IZI-06.1 VH y IZI-06.1 VL

40 Se sintetizó el DNA con codones optimizados que codifica los dos dominios variables humanizados (IZI-06.1 VH, (Id. de Sec. N° 7), IZI-06.1 VL (Id. de Sec. N° 8)) mediante GeneArt (Regensburg, Alemania) añadiendo las dianas de clonaje apropiadas (Fig. 2).

45 Ejemplo 3: Estructuras modelo de los fragmentos Fv de H398 y IZI-06.1

Las estructuras modelo de los fragmentos Fv de H398 y IZI-06.1 Fv se generaron utilizando el servidor Web Antibody Modelling (WAM) (Whitelegg N. R. J., Rees A. R., Web. Prot. Eng., 2000, N° 13, págs. 819-824). Un alineamiento de las dos estructuras modelo revela una elevada concordancia del esqueleto proteico y la conformación de las cadenas laterales, lo que incluye las CDR, con la excepción de CDRH3, que muestra una ligera distorsión (Fig. 3). Así, la Asp96 del extremo de la CDRH3 del modelo H398 y del modelo IZI-06.1 se ha movido aproximadamente 0,38 nm fuera de la región de unión del antígeno.

Ejemplo 4: Clonaje de IZI-06.1 y construcción de un fragmento de Ig monovalente (formato Fab)

55 Los genes que codifican los dominios variables de las cadenas pesada y ligera (VH, VL) del anticuerpo IZI-06.1 se sintetizaron mediante GeneArt y se proporcionaron en un vector pPCR-Script (pPCR-Script-IZI-06.1-VH, pPCR-Script-IZI-06.1-VL) que contenía las dianas de clonaje apropiadas. Para el clonaje del fragmento Fd (VH-CH1) (= construcción pAB1-IZI-06.1-Fd) se digirió el plásmido pPCR-Script-IZI-06.1-VH con las enzimas de restricción SfiI y XhoI, y el fragmento resultante se clonó en un vector pAB1-CH1 (que contenía el gen del dominio CH1 de la cadena pesada  $\gamma 1$  de inmunoglobulina humana) digerido con las mismas enzimas. Para el clonaje de la cadena ligera (VL-CL) (= construcción pAB1-IZI-06.1-L) se digirió el plásmido pPCR-Script-IZI-06.1-VL con las enzimas de restricción SfiI y AscI, y el fragmento resultante se clonó en un vector pAB1-CH1 (que contenía el gen del dominio C $\gamma$  humano) digerido con las mismas enzimas. El gen de la cadena ligera que incluyendo el punto de unión a ribosomas (RBS) codificado por el vector y la secuencia líder pelB se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pAB1-IZI-06.1-L

utilizando los cebadores A (5'-GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT TCC ACG GCA TGC AAA TTC-3') (Id. de Sec. N° 11) y B (5'-ACG ACG GCC AGT TCT AGA TTA ACA CT C TCC CCT GTT GAA-3') (Id. de Sec. N° 12). Con este paso se introducen las dianas HindIII y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y se clonó en el plásmido pAB1-IZI-06.1-Fd digerido con las mismas enzimas. Esto resulta en un plásmido final de expresión bacteriana pAB1-IZI-06.1-Fab que codifica un fragmento Fab del anticuerpo IZI-06.1, lo que incluye una cola de hexahistidilo en el extremo C-terminal del fragmento Fd.

Ejemplo 5: Sistema de expresión

- 10 Vector: pAB1 (Kontermann et al., 1997)
- Células: E.coli TG1 (Stratagene, La Jolla, U.S.A.)
- 15 Principio básico: La expresión del Fab IZI-06.1 está bajo control de P<sub>Lac</sub> y está inducida por IPTG de acuerdo con procedimientos estándar. La selección se consigue mediante la adición de ampicilina (*bla*-Gen).
- 20 La secuencia líder peLB en N-terminal permite la expresión periplasmática del producto génica diaria, eliminándose esta última de la proteína diaria a través del procesamiento proteolítico en el periplasma. La proteína diana (IZI-06.1) se aísla como una proteína soluble tras la desestabilización de la pared celular bacteriana con EDTA y lisozima. Las células bacterianas restantes se estabilizan osmóticamente como esferoblastos con tampón de sacarosa/ MgSO<sub>4</sub> para evitar la lisis celular, y las células se separan mediante centrifugación.
- 25 Expresión:
- Procedimiento: Cultivo en frascos en agitación, por lotes.
- 30 Pre cultivo: 50 mL de medio LB más 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 1 %, se inoculó con un cultivo de E.coli. Se incubó toda la noche a 30 °C en una plataforma giratoria (125 rpm).
- 35 Cultivo principal: 1 L de medio LB más 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 0,1 %, se inoculó con 5 % (V/V) de pre cultivo. Se incubó a 30°C en una plataforma giratoria (125 rpm). A una DO<sub>600</sub> (~ 3 h de tiempo de incubación) se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG (concentración final 1 mM). El tiempo de expresión fue de 3,5 h a 25°C.
- 40 Extracción: El cultivo se centrifugó 10 min a 4000 g. Los botones se resuspendieron en 50 mL de tampón de solubilización de periplasma PPA (PPA: Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, Sacarosa al 2 0%). Se añadió lisozima 50 µg/mL y se incubó la suspensión durante 30 min en hielo. Se eliminaron los esferoblastos mediante centrifugación a 18.000 g. El sobrenadante (extracto de periplasma) se dializó durante la noche con 200 x Vol. de PBS. El rendimiento típico de este protocolo de expresión/ extracción es de 1-2 mg de Fab IZI-06.1/L de cultivo.

Ejemplo 6: Purificación

- 50 Principio básico: Un protocolo de purificación en tres pasos con dos tandas de IMAC consecutivas seguidas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El IZI-06.1 es portador de una cola de myc-His en C-terminal (véase pAB1, estrategia de clonación). El primer y segundo paso de purificación es mediante IMAC (cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado). Los residuos de histidina dentro de la cola de His se unen específicamente a los iones de Ni quelados en el ligando en una matriz de Sefarosa. El segundo paso de IMAC es para concentrar el producto. Se realizó una SEC de forma semi-preparativa utilizando FPLC (Pharmacia, Alemania). Este paso separa de acuerdo con el PM relativo y permite la separación de agregados de mayor PM de la proteína diana así como proteínas de mayor y menor PM y contaminantes no proteicos. De forma específica, la proteína diana IZI-06.1 mal plegada y/o no procesada muestra un PM relativo mayor en la SEC y puede separarse del producto bioactivo correctamente plegado.
- 55
- 60

## ES 2 368 764 T3

### IMAC (1):

5	Columna:	HiTrap 5 mL (Ni-Ion quelante) (Amersham Pharmacia).
	Aplicación:	4 x 50 mL extracto periplásmico (dializado).
	Tasa de flujo:	0,5-1,0 mL/min.
10	Fracción de lavado:	Tampón fosfato sódico 25 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; Imidazol 2,5 mM, 5 X V <sub>(columna)</sub> .
	Elución:	Tampón fosfato sódico 25 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; Imidazol 500 mM.
15	Fracciones:	8 x 3,5 mL IZI-06.1 eluye predominantemente en las fracciones 2 y 3 (Figs. 5a, 5b). Las fracciones 2-4 se juntaron y dializaron con 500 x Vol. de PBS. El dializado resultante se concentró mediante un segundo paso de IMAC (IMAC 2).

### IMAC (2):

20	Columna:	HiTrap 1 mL (Ni-Ion quelante) (Amersham Pharmacia).
	Aplicación:	2 x 3 mL fracciones dializadas a partir de IMAC (1) (2 tandas).
25	Tasa de flujo:	0,5-1,0 mL/min
	Fracción de lavado:	Tampón fosfato sódico 25 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; Imidazol 2,5 mM, 5 X V <sub>(columna)</sub> .
30	Elución:	Tampón fosfato sódico 25 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; Imidazol 500 mM.
	Fracción:	8 x 1,0 mL

### SEC/ FPLC:

35	columna:	Super dex 200 (Pharmacia)
	Eluyente:	PBS (estéril filtrado)
40	Aplicación:	200 µL de fracción 2 o 3 a partir de IMAC(2)
	Tasa de flujo:	0,25 mL/min
45	Fracciones:	Nº 1-5: 1 mL, Nº 5-35: 0,5mL IZI-06.1 Fab está presente principalmente en las fracciones 24/25 (Fab activo mediante el bioensayo) y en pequeñas cantidades en las fracciones 20/21 (Fab menos activo, probablemente de forma predominante proteína mal plegada).

### Ejemplo 7: Actividad funcional de IZI-06.1 Fab

50 Características de unión, determinación de la afinidad de unión mediante estudios de equilibrio de unión:

Para la determinación de la afinidad a TNFR1, se realizaron estudios de saturación de unión a 4°C con IZI-06.1 Fab marcado de forma radiactiva. El anticuerpo se marcó con yodo 125 utilizando el método de la cloramina T. En resumen, 10 µg de proteína purificada se incubó en tampón fosfato (pH 7,4) a temperatura ambiente con 3,7 x 10<sup>7</sup> Becquerel de Na<sup>125</sup>I junto con cloramina T. La reacción se detiene con Na-disulfito y exceso de NaI y las proteínas marcadas se separan mediante filtración en gel utilizando una columna PD10. (Pharmacia). Se recogieron fracciones de un mililitro. La proteína se eluyó en las fracciones 2 y 3, se detectó <sup>125</sup>I libre en las fracciones 7 a 9. La concentración de proteína resultante fue de 2,7 µg/ml y la radioactividad fue de 120.000 cpm/ng. El material bioactivo se determinó mediante la incubación de cantidades constantes de IZI-06.1 Fab marcado con cantidades crecientes de células de fibroblasto de ratón que expresan TNFR1-Fas. La curva hiperbólica resultante se utilizó para ajustar una ecuación de unión de un sitio mediante regresión lineal y el valor de unión máximo extrapolado (B<sub>max</sub>) representaba el porcentaje de material bioactivo (aprox. 10%). Los datos de este análisis se utilizaron para calcular las concentraciones de anticuerpo aplicadas en los siguientes experimentos.

Para determinar la afinidad (valor  $K_D$ ) de IZI-06.1 Fab, se incubaron 200.000 células positivas para TNFR1-Fas en hielo durante tres horas con concentraciones crecientes de IZI-06.1 marcada (2,5 - 50 ng en un volumen total de 150  $\mu$ l). Como tampón de unión, se utilizó tampón fosfato salino + 2% suero fetal bovino + 0,02 % de  $\text{NaN}_3$ . Se determinó la unión no específica mediante la coincubación de células con la concentración correspondiente 180 veces superior de IZI-06.1 no marcada. La unión de IZI-06.1 Fab se determinó con un contador gamma y los datos resultantes se utilizaron para ajustar una hipérbola de unión de un sitio que contiene la constante de saturación de la unión  $K_D$ :

$$\text{Unido} = (B_{\text{max}} \times [\text{IZIFab}]) / ([\text{IZIFab}] + K_D)$$

La calidad de los datos se evaluó al realizar una transformación por a linealización, también conocida como representación de Scatchard. Los datos resultantes muestran que la unión de IZI-06.1 a TNFR1 es saturable y específica, con una afinidad aparente de  $K_D = 0,778$  nM.

Características de unión, selectividad de TNFR1 y mapeo de epítomos mediante intercambio/delección del dominio de receptor y análisis de FACS:

Se utilizó un IZI-06.1-Fab positivo para la cola de His para determinar la especificidad de la unión de TNFR1 o unión de TNFR1-Fas, respectivamente así como la caracterización del epítopo reconocido por el derivado de anticuerpo. La Figura 7A muestra un análisis de citometría de flujo por inmunofluorescencia indirecto. El IZI-06.1-Fab tiñe positivamente las células que expresan la quimera TNFR1-Fas en comparación con el control negativo (reactivo de detección: anticuerpo específico de His marcado con FITC). La intensidad comparablemente baja de la tinción en comparación con el IF indirecto con mab225 específico de TNFR1 (Fig. 7D) se sabe que es debido principalmente a los diferentes reactivos secundarios de detección utilizados (anticuerpo específico de detección de His-tag versus anticuerpo de detección anti Ig de ratón). La unión no específica ocurre sobre las células que expresan TNFR2-Fas en comparación con el Control negative, el anticuerpo 80M2 específico de TNFR2 que sirve como control positivo (Fig. 7B). La unión no específica ocurre sobre una célula positiva para construcciones de TNFR1-Fas, en las que el dominio distal de membrana rico en cisteínas (CRD) 1 ha sido eliminado (Fig. 7C). Esta construcción, no obstante, se puede detectar fácilmente mediante otro mab específico de TNFR1, mab225 (Fig 7D). Además, no ocurre tinción específica sobre una célula que expresa una construcción TNFR1-Fas funcional (competente de señales), en el que la membrana distal CRD1 ha sido sustituida por la del TNFR2 (Fig. 7E). De nuevo, esta quimera de receptor se puede detectar fácilmente mediante el mab225, conocido por unirse a TNFR1 fuera del CRD1. Los datos mostrados en la fig. 7C-F permiten por lo tanto concluir que IZI-06.1 reconoce el CRD1 de TNFR1. Los inventores saben que CRD1 está involucrado de forma crítica en la unión de TNF influyendo en la conformación de CRD2, proporcionando este último, junto con CRD3, uno de los sitios de contacto directos al ligando (datos no publicados por los inventores).

Inhibición de la acción de TNF:

Se analizó el IZI-06.1 Fab purificado para la actividad antagonista en un modelo de línea celular de sarcoma humano Kym-1, que es altamente sensible a TNF (LD50 por debajo de 100 pg/ml de sTNF, sin necesidad de inhibición de la síntesis de proteínas) y responde a través de ambos TNFR1 y TNFR2 (la ruta de señalización de este último mostró previamente la inducción mediante la señalización endógena de NF- $\kappa$ B la expresión de TNF y la posterior señalización autotrópica de la apoptosis de la membrana expresada por TNF mediante TNFR1; (Grell et al., EMBO J., 1999, N° 18, p. 3034-3043). La actividad antagonista de IZI-06.1 Fab se compara con mab H398 murino y se prepara enzimáticamente el Fab a partir de H398. La Figura 8 muestra el bloqueo eficiente y completo de TNF mediado por la acción citotóxica sobre las células Kym-1 mediante IZI-06.1 Fab, a concentraciones dos a cuatro veces inferiores si se comparan con Fab H398. El mab de longitud completa, tal como se esperaba de resultados anteriores, muestra una mayor actividad neutralizadora en comparación con los Fab monovalentes a concentraciones inferiores, probablemente debido a una tasa del reactivo divalente más baja (mayor avidéz). Es importante destacar que, el mab H398 no logra un bloqueo completo de la actividad de TNF en este ensayo in vitro tan sensible, debido a la conversión a partir de un antagonista en un agonista parcial a altas concentraciones. Esto se explica mediante el aumento de pendiente de dosis en el entrecruzamiento de TNFR, formando así de forma potencial complejos funcionales de señalización de TNFR independientes de ligando, (véase también Moosmayer et al., Ther. Immunol., 1995, N° 2, p. 31-30)

En resumen, de acuerdo con la presente invención, una de las características clave sorprendentes e inesperadas es que el antagonista IZI-06.1 Fab específico de TNFR1 muestra un bloqueo superior de la actividad de TNFR1 en comparación con un existente Fab murino de la misma especificidad y es superior a un mab de longitud completa debido a la completa falta de capacidad de entrecruzamiento de TNFR, es decir IZI-06.1 Fab carece de potencial intrínseco de señalización y por tanto un verdadero antagonista de TNFR1.

Ejemplo 8: Fv IZI-06.1 de cadena sencilla y derivados del mismo

Clonaje y expresión de scFv IZI-06.1 (VH-VL):

- 5 ScFv IZI-06.1 (VH-VL) está generado mediante un clonaje de dos pasos en el vector fagémido pH EN2 introduciendo un enlace de 15 residuos (GGGGSGGGGSGGSAQ) (Id. de Sec. N°: 13) codificado en un vector así como una secuencia líder pElB en N-terminal y una cola myc y cola hexahistidilo (His6) en C-terminal. Para la expresión soluble, la secuencia que codifica el scFv se obtiene mediante la digestión del plásmido de DNA pHEN2-scFv IZI-06.1 (VH-VL) con las enzimas de restricción SfiI y NotI y el clonaje del fragmento resultante en el vector de expresión pAB1 se digiere con las mismas enzimas. La expresión y purificación se realiza como sigue: 2 L de 2xTY, 10 100 µg/mL de ampicilina, 0,1% de glucosa se inocula durante la noche con 20 ml de cultivo de TG1 transformado y se hace crecer hasta fase exponencial (DO<sub>600</sub>=0,8) a 37°C. La expresión de proteínas se induce mediante la adición de IPTG 1 mM y las bacterias se hacen crecer durante 3 h adicionales a 37°C. Las células se recogen mediante centrifugación y se resuspenden en 100 ml de Tris-HCl 30 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, sacarosa al 20%. Tras la adición de 5 mg de lisozima, las células se incubaron durante 15-30 min sobre hielo. Tras la adición de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM las células se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min, 4°C. El sobrenadante se dializó con PBS y se cargó en una columna Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania) equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM. Tras un paso de lavado (tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 35 mM) se eluyeron los fragmentos de anticuerpo recombinante con cola de His con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 100 mM. Las fracciones de proteína se juntaron y dializaron con PBS. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente y se calculó utilizando el valor e calculado de cada proteína.

Clonaje y expresión de una proteína de fusión scFv IZI-06.1-albúmina:

- 25 Se generó una proteína de fusión de albúmina con scFv IZI-06.1 (VH-VL) humano (Id. de Sec. N°: 10) mediante la clonación del DNA que codifica scFv IZI-06.1 (VH-VL) de un plásmido, pAB1 como fragmento SfiI-NotI en un plásmido pSecTagA-HSA que contiene el cDNA que codifica la albúmina humana. El plásmido de DNA se transfectó con Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) en células HEK293. Los transfectantes establecidos se generaron mediante selección con zeocina (300 µg/ml). Las células se expandieron y crecieron hasta una confluencia del 90% en medio RPMI, FCS 5%. Para la producción de proteína, las células se cultivaron en Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) sustituyendo el medio cada 3 días durante 3-4 veces. Los sobrenadantes se juntaron y las proteínas se concentraron mediante precipitación con sulfato de amonio (saturación del 60%), antes de cargar en una columna Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania). La purificación mediante IMAC se realizó tal como se ha descrito antes

Listado de secuencias

- <110> Universität Stuttgart pfizenmaier, Klaus  
 <120> Antagonistas selectivos de huTNFR1  
 40 <130> ninguno  
 <160> 17  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 10  
 45 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 1

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

- 50 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 2

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu  
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Ala  
 20

- 55 <210> 3  
 <211> 6

<212> PRT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 3

Trp Asp Phe Leu Asp Tyr  
 1 5

5 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> PRT

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

Trp Tyr

<213> Mus Musculus  
 <400> 4

10

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT

15 <213> Mus Musculus  
 <400> 5

Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus Musculus  
 <400> 6

20

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> IZI-06.1 VH - fragmento de anticuerpo humanizado  
 <400> 7

25

30

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe  
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
 <220>

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

Arg

<223> IZI-06.1 VL - fragmento de anticuerpo humanizado

<400> 8  
 10 <210> 9  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> scFv IZI-06.1 VH-VL - fragmento de anticuerpo humanizado  
 <400> 9

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



ES 2 368 764 T3

<210> 10  
 <211> 867  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Proteína de fusión scFv IZI-06.1 HSA  
 <400> 10  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Val Asp Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys  
 35 40 45  
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Ile Asn Trp Val Arg  
 50 55 60  
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr  
 65 70 75 80  
 Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala Arg Val Thr Ile  
 85 90 95  
 Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu  
 100 105 110  
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Phe Leu  
 115 120 125  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Gln Asp Ile Val Met  
 145 150 155 160  
 Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser  
 165 170 175  
 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr  
 180 185 190  
 Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu  
 195 200 205  
 Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro  
 245 250 255  
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala  
 260 265 270  
 Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe  
 275 280 285  
 Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe  
 290 295 300  
 Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val

ES 2 368 764 T3

305			310						315					320	
Asn	Glu	Val	Thr	Glu 325	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys 330	Val	Ala	Asp	Glu	Ser 335	Ala
Glu	Asn	Cys	Asp 340	Lys	Ser	Leu	His	Thr 345	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys 350	Leu	Cys
Thr	Val	Ala 355	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr 360	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala 365	Asp	Cys	Cys
Ala	Lys 370	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg 375	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu 380	Gln	His	Lys	Asp
Asp 385	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro 390	Arg	Leu	Val	Arg 395	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met 400
Cys	Thr	Ala	Phe	His 405	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr 410	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr 415	Leu
Tyr	Glu	Ile	Ala 420	Arg	Arg	His	Pro	Tyr 425	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu 430	Leu	Leu
Phe	Phe	Ala 435	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala 440	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys 445	Cys	Gln	Ala
Ala	Asp 450	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu 455	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp 460	Glu	Leu	Arg	Asp
Glu 465	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser 470	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu 475	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu 480
Gln	Lys	Phe	Gly	Glu 485	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala 490	Trp	Ala	Val	Ala	Arg 495	Leu
Ser	Gln	Arg	Phe 500	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe 505	Ala	Glu	Val	Ser	Lys 510	Leu	Val
Thr	Asp	Leu 515	Thr	Lys	Val	His	Thr 520	Glu	Cys	Cys	His	Gly 525	Asp	Leu	Leu
Glu	Cys 530	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala 535	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn
Gln 545	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser 550	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys 555	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu 560
Leu	Glu	Lys	Ser	His 565	Cys	Ile	Ala	Glu	Val 570	Glu	Asn	Asp	Glu	Met 575	Pro
Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val

ES 2 368 764 T3

```

                580                585                590
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Phe Leu
   595                600                605
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
   610                615
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
   625                630                640
Ala Asp Phe His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
   645                650                655
Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
   660                665
Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
   675                680                685
Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
   690                695                700
Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
   705                710                715                720
Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
   725                730                735
Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
   740                745                750
Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
   755                760                765
Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
   770                775                780
Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
   785                790                795                800
Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
   805                810                815
Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
   820                825                830
Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
   835                840                845
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Gly Gly His His His

```

<210> 11

```

                850                855                860

```

```

His His His
865

```

<211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial.

5 <220>  
 <223> Cebador A  
 <400> 11  
 gaccatgatt acgccaagct ttccacggca tgcaaattc 39

10 <210> 12  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador B

ES 2 368 764 T3

<400> 12  
 acgacggcca gttctagatt aacctctcc cctgttgaa 39  
 <210> 13  
 <211> 15  
 5 <212> PRAT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Residuos del enlazante

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

<400> 13  
 10 <210> 14  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> IZI-06.1 VH - fragmento de anticuerpo humanizado VH  
 <400> 14

**caggttcagc tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60**  
**agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatttctaca ttaactgggt gcgtcaggca 120**  
**ccgggtcagg gcctggaatg gattggcgaa atttatccgt atagcggcca tgcataattac 180**  
**aacgaaaaat tcaaagcgcg tgtgaccatt accgcggata aaagcaccag caccgcgtat 240**  
**atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat accgcggtgt attattgcdc gcgttgggat 300**  
**tttctggatt attggggcca gggcaccacc gttacggctc cgagt 345**

<210> 15  
 20 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> IZI-06.1 VL - fragmento de anticuerpo humanizado  
 25 <400> 15

**gatattgtga tgaccagag cccgctgtct ctgccggtca cgccgggtga accggcgagc 60**  
**attagctgcc gtagcagcca gagcctgctg catagcaacg gcaacaccta tctgcattgg 120**  
**tatctgcaga aaccgggcca gagcccgcag ctgctgattt ataccgtgag caaccgtttt 180**  
**agcggcgtgc cggatcgctt tagcggcagc ggtagcggca ccgattttac cctgaaaatt 240**  
**agccgtgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgca gccagagcac ccatgtgccg 300**  
**tatacctttg gcggtggcac caaagtggaa attaaacgt 339**

<210> 16  
 <211> 867  
 <212> DNA  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> scFv IZI-06.1 - fragmento de anticuerpo humanizado  
 <400> 16

ES 2 368 764 T3

atgaaatacc tattgctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60  
atgcccagg ttcagctggt tcagagcggg gcggaagtga aaaaaccggg cagcagcgtg 120  
aaagtgagct gcaaagcgag cggctataacc tttaccgatt tctacattaa ctgggtgctg 180  
caggcaccgg gtcagggcct ggaatggatt ggcgaaattt atccgtatag cggccatgca 240  
tattacaacg aaaaattcaa agcgcgtgtg accattaccg cggataaaag caccagcacc 300  
gcgtatatgg aactgagcag cctgcgtagc gaagataccg cgggtgatta ttgcgcgcgt 360  
tgggattttc tggattattg gggccagggc accaccgta cggctcgcag tgggtggaggc 420  
ggttcaggcg gaggtggctc tggcggtagt gcacaagata ttgtgatgac ccagagcccg 480  
ctgtctctgc cggtcacgcc ggggtgaaccg gcgagcatta gctgccgtag cagccagagc 540  
ctgctgcata gcaacggcaa cacctatctg cattggatc tgcagaaacc gggccagagc 600  
ccgcagctgc tgatttatac cgtgagcaac cgttttagcg gcgtgccgga tcgcttttagc 660  
ggcagcggta gcggcaccga tttaccctg aaaattagcc gtgtggaagc ggaagatgtg 720  
ggcgtgtatt attgcagcca gagcaccat gtgccgtata cctttggcgg tggcaccaaa 780  
gtggaatta aacgtgcggc cgcagaaca aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 840  
gccgcacatc accatcatca ccattaa 867

<210> 17

<211> 2604

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> scFv IZI-06.1 HSA proteína de fusión

<400> 17

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccacc ggttgacgcg 60  
gcccagccgg ccatggcca ggttcagctg gttcagagcg gtgcggaagt gaaaaaacccg 120  
ggcagcagcg tgaagtgtg ctgcgcaagcg agcggctata cctttaccga tttctacatt 180  
aactgggtgc gtcaggcacc gggtcagggc ctggaatgga ttggcgaat ttatccgtat 240  
agcggccatg catattaca cgaaaaattc aaagcgcgtg tgaccattac cgcggataaa 300  
agcaccagca ccgcgtatat ggaactgagc agcctgcgta gcgaagatac cgcgggtgat 360  
tattgcgcgc gttgggattt tctggattat tggggccagg gcaccaccgt tacggctctc 420  
agtgggtggg gcggttcagg cggaggtggc tctggcggta gtgcacaaga tattgtgatg 480  
accagagccg cgctgtctct gccggtcacg ccgggtgaac cggcgagcat tagctgctgt 540  
agcagccaga gcctgctgca tagcaacggc aacacctatc tgcatggta tctgcagaaa 600  
ccgggccaga gcccgcagct gctgatttat accgtgagca accgttttag cggcgtgccg 660  
gatcgttta gcggcagcgg tagcggcacc gattttacc tgaatttag ccgtgtggaa 720  
gcggaagatg tggcgtgta ttattgcagc cagagcacc atgtgccgta tacctttggc 780  
ggtggcacca aagtggaaat taaacgtgcg gccgcaggtg gatcagcgg tgatgcacac 840  
aagagtgagg ttgctcatcg gtttaaagat ttgggagaag aaaatttcaa agccttgggtg 900  
ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag tgtccatttg aagatcatgt aaaattagtg 960  
aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt gttgctgatg agtcagctga aaattgtgac 1020  
aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaatc 1080  
tatggtgaaa tggctgactg ctgtgcaaaa caagaacctg agagaaatga atgcttcttg 1140  
caacacaaag atgacaaccc aaacctcccc cgattgggtg gaccagaggt tgatgtgatg 1200  
tgactgctt tcatgacaa tgaagagaca tttttgaaaa aatacttata tgaaattgcc 1260  
agaagacatc cttactttta tgccccggaa ctccttttct ttgctaaaag gtataaagct 1320  
gcttttacag aatgttgcca agctgctgat aaagctgcct gcctgttgcc aaagctcgat 1380

10

ES 2 368 764 T3

gaacttcggg atgaagggaa ggcttcgtct gccaaacaga gactcaagtg tgccagtctc	1440
caaaaatttg gagaaagagc tttcaagca tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt	1500
cccaaagctg agtttgaga agtttccaag ttagtgcag atcttacaa agtccacacg	1560
gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt gctgatgaca gggcggacct tgccaagtat	1620
atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg	1680
ttgaaaaat cccactgcat tgccgaagtg gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgctt	1740
tcattagctg ctgattttgt tgaaagtaag gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaag	1800
gatgtcttcc tgggcatggt tttgtatgaa tatgcaagaa ggcacctctga ttactctgtc	1860
gtgctgctgc tgagacttgc caagacatat gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgct	1920
gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg ttcgatgaat ttaaacctct tgtggaagag	1980
cctcagaatt taatcaaaaca aaattgtgag ctttttgagc agcttggaga gtacaaattc	2040
cagaatgcgc tattagtctg ttacaccaag aaagtacccc aagigtcaac tccaactctt	2100
gtagaggctc caagaaacct aggaaaagtg ggcagcaaat gttgtaaaca tcctgaagca	2160
aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta tccgtgttcc tgaaccagtt atgtgtgtg	2220
catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc accaaatgct gcacagaatc cttggtgaac	2280
aggcgaccat gcttttcagc tctggaagtc gatgaaacat acgttcccaa agagttaat	2340
gctgaaacat tcaccttcca tgcagatata tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc	2400
aagaaacaaa ctgcacttgt tgagctcgtg aacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa	2460
ctgaaagctg ttatggatga tttcgcagct tttgtagaga agtgcctgcaa ggctgacgat	2520
aaggagacct gctttgccga ggagggtaaa aaacttgttg ctgcaagtca agctgccggt	2580
ggccaccatc atcaccatca ctaa	2604

**REIVINDICACIONES**

1. Un ligando de huTNFR1 que comprende una construcción de proteínas con (i) una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaces de reducir la respuesta inmunogénica de dicho ligando del huTNFR1 en humanos, y (ii) una o más secuencias de aminoácidos de origen no humano capaces de unirse de forma selectiva al huTNFR1, en la que la construcción de proteínas comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 como dominio variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. N° 8 como dominio variable de la cadena ligera (VL), o un fragmento de un anticuerpo humanizado, siendo el fragmento una scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. N° 9.
2. El ligando de huTNFR1 de acuerdo con reivindicación 1, que comprende una cola adicional que permite la interacción específica con un compuesto aceptable a nivel biológico.
3. El ligando de huTNFR1 de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la construcción de proteínas además comprende un compuesto aceptable a nivel biológico unido de forma no covalente o unido de forma covalente a ésta mediante la conjugación química post-traducciona l o mediante tecnología de DNA recombinante.
4. El ligando de huTNFR1 de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el compuesto aceptable a nivel biológico se selecciona de entre el grupo que consiste en las proteínas séricas.
5. El ligando de huTNFR1 de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que el compuesto aceptable a nivel biológico es la albúmina.
6. El ligando de huTNFR1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 5, en las que la construcción de proteínas comprende una proteína de fusión con albúmina sérica humana de acuerdo con el Id. de Sec. N° 10.
7. Un ácido nucleico que codifica el ligando del huTNFR1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6.
8. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una célula huésped aislada que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 o el vector de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva a nivel terapéutico del ligando del huTNFR1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, y opcionalmente uno o más componentes adicionales seleccionados de entre el grupo que consiste en un transportador aceptable a nivel farmacéutico, sales aceptables a nivel farmacéutico, un agente auxilia r, un estabilizante, un diluyente y un solvente, o cualquier combinación de los mismos.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para el tratamiento de la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunes, infecciones virales o bacterianas agudas fulminantes, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, preferiblemente seleccionadas de entre la esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y Alzheimer, enfermedades genéticas hereditarias en las que TNF/TNFR1 es el mediador patológico causante, preferiblemente seleccionadas de entre el síndrome de la fiebre periódica y el querubismo, y el cáncer.
12. Un proceso para la producción de un ligando de huTNFR1 con una respuesta inmunogénica reducida cuando se administra a un ser humano, que comprende los pasos de (a) proporcionar una construcción de proteína como la que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, (b) identificar una o más secuencias de aminoácidos de origen humano capaces de unirse de forma selectiva al huTNFR1 mediante selección guiada utilizando una o más de las secuencias de aminoácidos de la construcción de proteína como matriz, y (c) construir el ligando que comprende al menos una o más de las secuencias de aminoácidos identificadas en el paso (b).
13. La utilización de un ligando de huTNFR1 que comprende una construcción de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, como matriz para la selección guiada en la identificación y construcción de otro ligando de huTNFR1 de baja inmunogenicidad que comprende sólo secuencias de aminoácidos de origen humano.

V<sub>H</sub>

	FR1	CDRH1	FR2	CDRH2
H398-VH	QVQLQESGAEIARPGASVKLSCKAS	GYTFIDFYIN	WVKQRTGQGLE	WIGBIYPYSGHAYTNEKPKA
IZI-06.1 VH	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVCKAS	GYTFIDFYIN	WVRQAPGQGLE	WIGBIYPYSGHAYTNEKPKA
VH1-69	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVCKAS	GGTFSSYALS	WVRQAPGQGLE	WMGGIIPFGTANYAQKPGQ
	**	***	*	*****

	FR3	CDRH3	FR4
H398-VH	KATLTADKSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYFCVR	WDFLDY	WQGGTTLIVSS
IZI-06.1 VH	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WDFLDY	WQGGTIVIVSS
VH1-69	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR		
	** *	*	*

V<sub>L</sub>

	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2
H398-VL	DIVMTQSPFLSLPVSIGDQASISC	RSSQSLLSHNGNTYLHWY	VQKPGQSPK	LLIYTVSNRFS
IZI-06.1 VL	DIVMTQSPFLSLPVTGEPASISC	RSSQSLLSHNGNTYLHWY	LQKPGQSPQ	LLIYTVSNRFS
A3	DIVMTQSPFLSLPVTGEPASISC	RSSQSLLSHNGNTYLDWY	LQKPGQSPQ	LLIYLGSNRAS
	** **	**	*	** *

	FR3	CDRL3	FR4
H398-VL	GVPDRFSGSGSGTDPTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPTT	FGGGTKLEIKR
IZI-06.1 VL	GVPDRFSGSGSGTDPTLKISRVEAEDVGVYIC	SQSTHVPTT	FGGGTKVEIKR
A3	GVPDRFSGSGSGTDPTLKISRVEAEDVGVYIC	MQALQTP	
	*	* * * * *	

Fig. 1



**IZI-06.1 VH**

<sup>KpnI</sup> <sup>SfiI</sup>  
 1 GGT ACC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTT CAG CTG GTT CAG AGC GGT GCG GAA GTG  
 G T A A Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V  
 61 AAA AAA CCG GGC AGC AGC GTG AAA GTG AGC TGC AAA GCG AGC GGC TAT ACC TTT ACC GAT  
 K K P G S S V K V S C K A S G Y T F T D  
 121 TTC TAC ATT AAC TGG GTG CGT CAG GCA CCG GGT CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGC GAA ATT  
 F Y I N W V R Q A P G Q G L E W I G E I  
 181 TAT CCG TAT AGC GGC CAT GCA TAT TAC AAC GAA AAA TTC AAA GCG CGT GTG ACC ATT ACC  
 Y P Y S G H A Y Y N E K F K A R V T I T  
 241 GCG GAT AAA AGC ACC AGC ACC GCG TAT ATG GAA CTG AGC AGC CTG CGT AGC GAA GAT ACC  
 A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T  
 301 GCG GTG TAT TAT TGC GCG CGT TGG GAT TTT CTG GAT TAT TGG GGC CAG GGC ACC ACC GTT  
 A V Y Y C A R W D F L D Y W G Q G T T V  
  
<sup>XhoI</sup> <sup>SacI</sup>  
 361 ACG GTC TCG AGT GAG CTC  
 T V S S E L

**IZI-06.1 VL**

<sup>KpnI</sup> <sup>SfiI</sup>  
 1 GGT ACC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT ATT GTG ATG ACC CAG AGC CCG CTG TCT CTG  
 G T A A Q P A M A D I V M T Q S P L S L  
 61 CCG GTC ACG CCG GGT GAA CCG GCG AGC ATT AGC TGC CGT AGC AGC CAG AGC CTG CTG CAT  
 P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H  
 121 AGC AAC GGC AAC ACC TAT CTG CAT TGG TAT CTG CAG AAA CCG GGC CAG AGC CCG CAG CTG  
 S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L  
 181 CTG ATT TAT ACC GTG AGC AAC CGT TTT AGC GGC GTG CCG GAT CGC TTT AGC GGC AGC GGT  
 L I Y T V S N R F S G V P D R F S G S G  
 241 AGC GGC ACC GAT TTT ACC CTG AAA ATT AGC CGT GTG GAA GCG GAA GAT GTG GGC GTG TAT  
 S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y  
 301 TAT TGC AGC CAG AGC ACC CAT GTG CCG TAT ACC TTT GGC GGT GGC ACC AAA GTG GAA ATT  
 Y C S Q S T H V P Y T F G G G T K V E I  
  
<sup>AscI</sup> <sup>SacI</sup>  
 361 AAA CGT GGC GCG CCA GAG CTC  
 K R G A P E L

Fig. 2

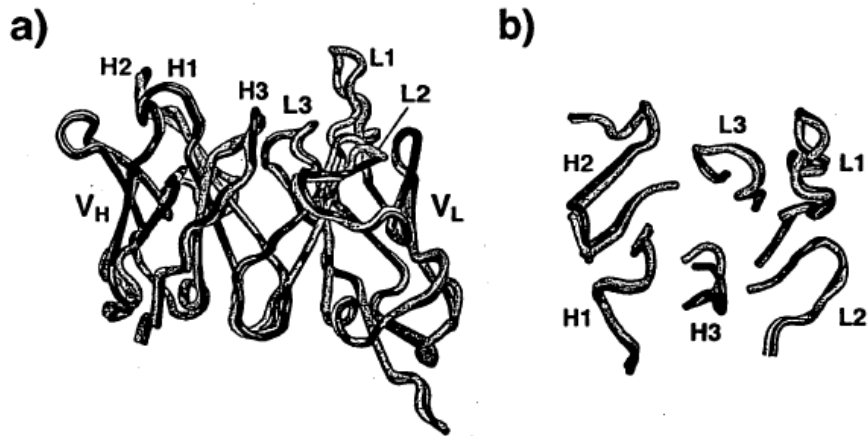


Fig. 3

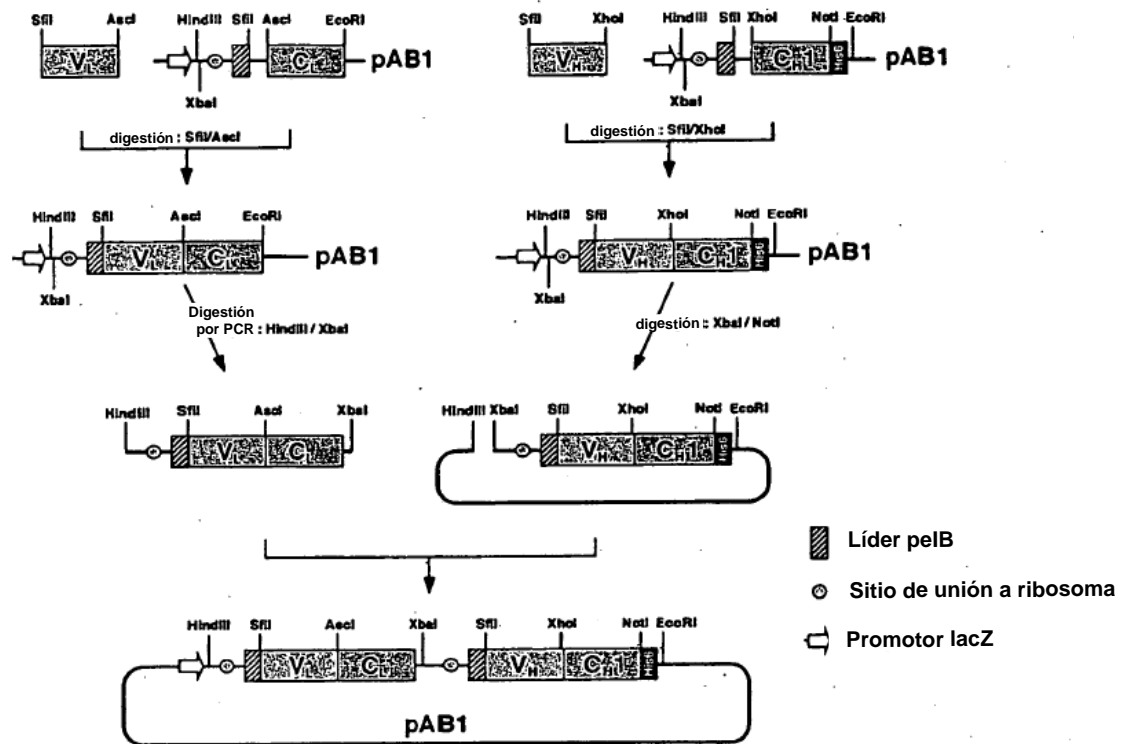


Fig. 4

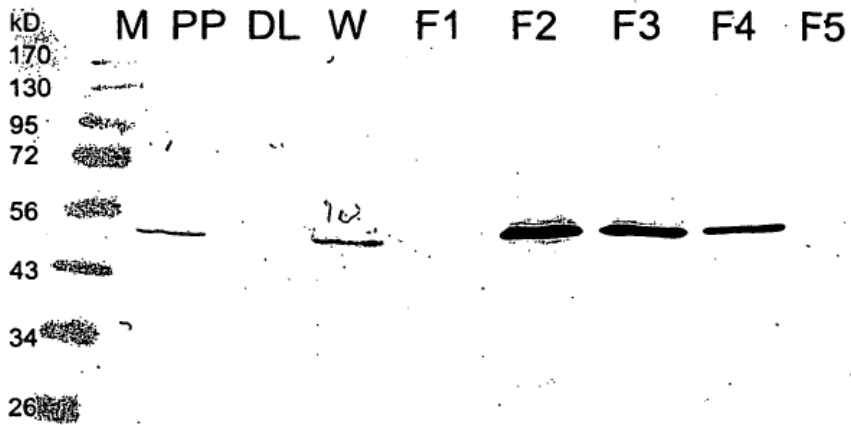


Fig. 5a

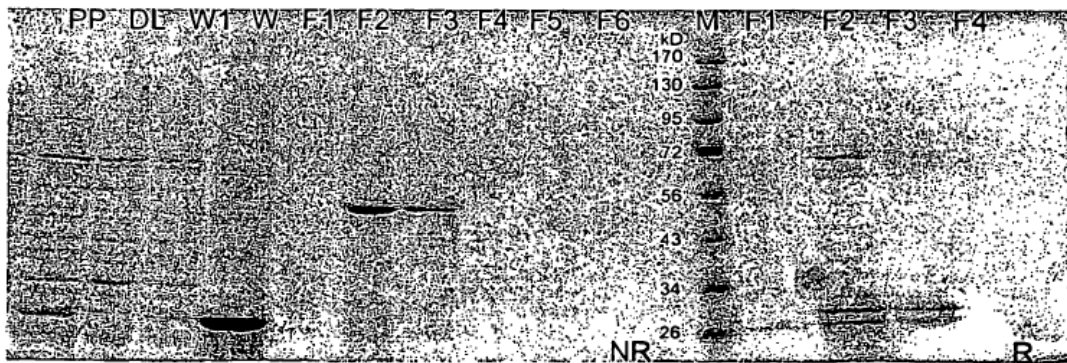


Fig. 5b

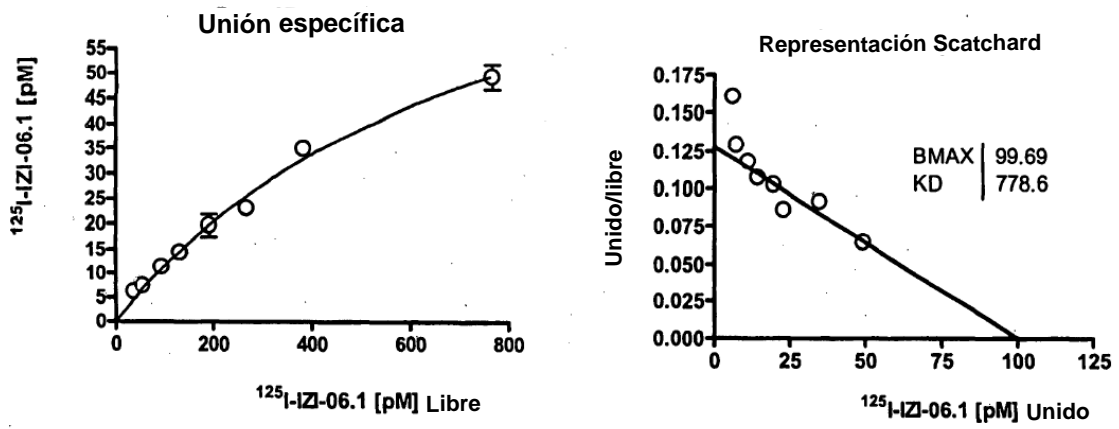
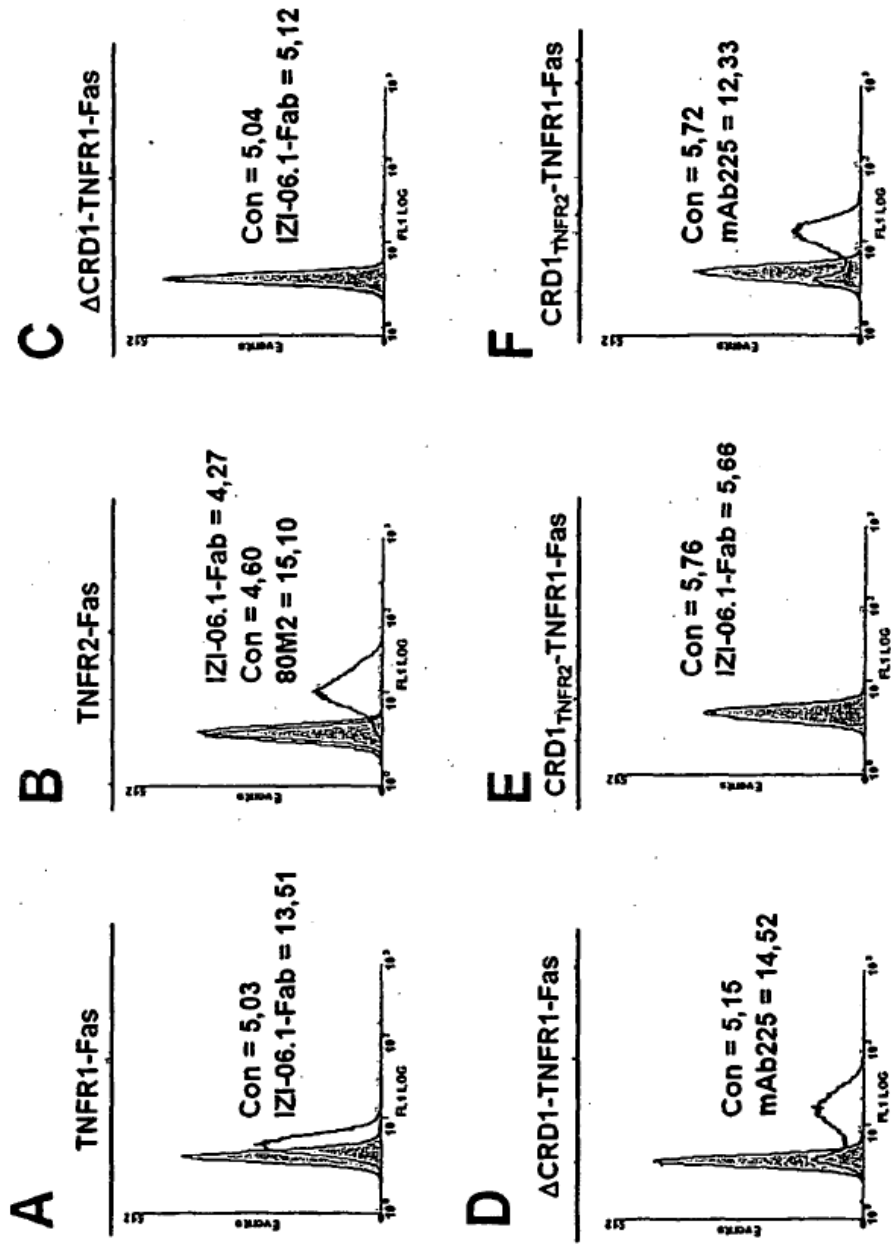


Fig.6

5



Figuras 7A a 7F

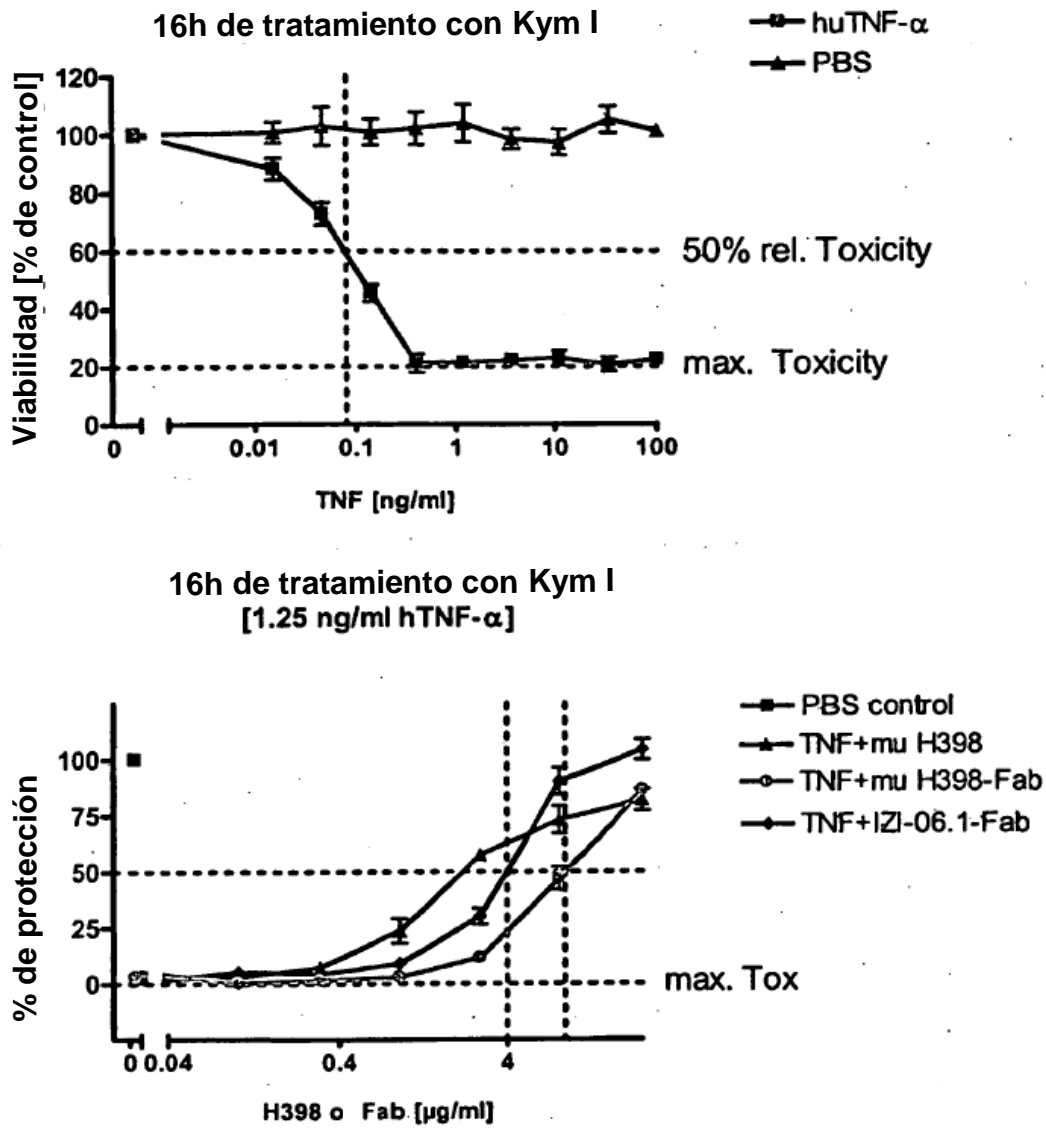


Fig. 8

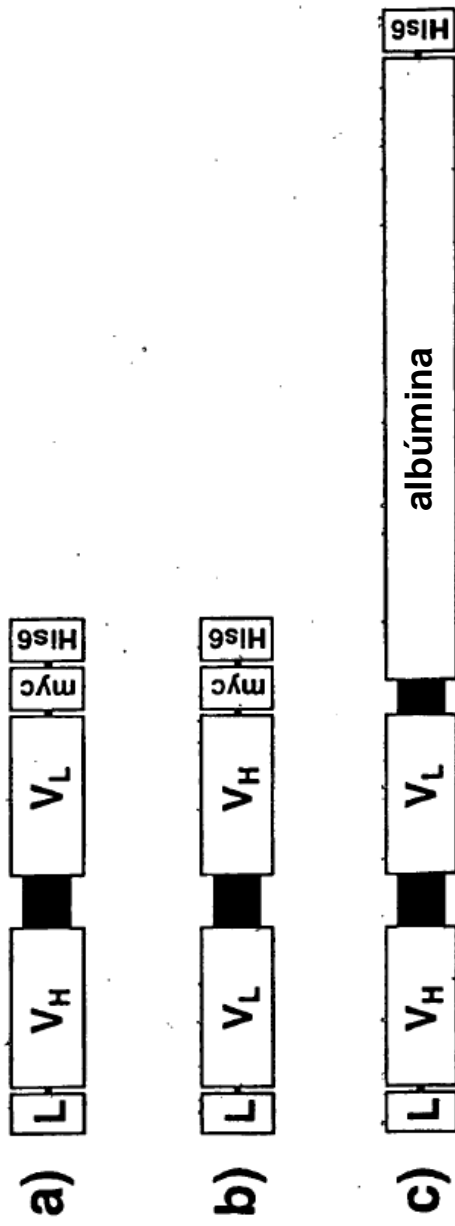


Fig. 9