

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 830**

51 Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04770592 .6**
96 Fecha de presentación: **05.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1678210**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Anticuerpos anti-NIK y sus usos**

30 Prioridad:
07.10.2003 IL 15828703

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2012

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/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 830 T3

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

DESCRIPCIÓN

ANTICUERPOS ANTI-NIK Y SUS USOS.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a moléculas inmunorreguladoras. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos o a fragmentos de anticuerpos, tal y como se definen en las reivindicaciones, capaces de unirse específicamente a la cinasa inductora de NF- κ B (NIK)/MAP3K14, o a una porción específica de la misma.

Antecedentes de la invención

10 No existe ningún tratamiento o ninguno que sea satisfactorio para numerosas enfermedades letales y/o sumamente debilitantes, asociadas con una alteración de la regulación de la actividad de moléculas NF- κ B, que incluyen enfermedades cancerígenas y enfermedades asociadas con respuestas inmunes patológicas, tales como enfermedades autoinmunes, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con trasplantes.

15 Las moléculas de la familia NF- κ B son complejos de factores de transcripción eucariotas, esenciales para la regulación de la respuesta inmune, el crecimiento celular y la supervivencia (Ghosh S y col., 1998. *Annu Rev Immunol.* 16:225-60), que se activan de forma inducible por casi todos los miembros de la familia de receptores TNF/NGF. Las moléculas NF- κ B son secuestradas generalmente en el compartimento citoplásmico mediante una asociación física con una familia de inhibidores citoplásmicos ricos en anquirina, denominados I κ B, que incluyen I κ B α y proteínas relacionadas (Baldwin AS. Jr., 1996. *Annu Rev Immunol.* 14:649-83). Como respuesta a diversos estímulos, que incluyen citocinas, mitógenos, y ciertos productos génicos víricos, I κ B es rápidamente fosforilada en Ser32 y Ser36, y se ubiquitina y se degradada posteriormente con el proteasoma 26S. Esto permite que la NF- κ B liberada se traslade al núcleo y participe en la transactivación del gen diana (Mercurio F. y Manning A.M., 1999. *Curr Opin Cell Biol.* 11:226-32; Pahl, H.L., 1999. *Oncogene* 18:6853-66). Recientes estudios de clonación molecular han identificado un complejo con múltiples subunidades de cinasa de I κ B (IKK) que media en la fosforilación inducida con señal, de I κ B, el 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 se puede activar por una variedad de diferentes inductores de NF- κ B, que incluyen citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1), el receptor de linfocitos T (TCR) y la proteína coestimuladora de linfocitos T, CD28 (Karin, M. y Ben-Neriah, Y., 2000. *Annu Rev Immunol.* 18:621-63).

20 La cinasa inductora de NF- κ B (NIK, del inglés, NF- κ B-inducing kinase)/MAP3K-14 (Publicación de la OMPI n° WO9737016A1 de los presentes inventores) es decisiva para la activación de NF- κ B. Por ejemplo, se ha mostrado que la hiperexpresión de NIK conduce a una activación espectacular de NF- κ B (revisado por Wallach D. y col., 2002. *Arthritis Res.* 4 Supl. 3:p189-96), y que la expresión de mutantes de NIK catalíticamente inactivos conduce a la inhibición eficaz de la activación de NF- κ B como respuesta a una variedad de activadores conocidos de NF- κ B, tales como LMP1, receptor de TNF (TNFR)-1, TNFR-2, RANK, receptor Toll humano, CD3/CD28, receptor de IL-1 (IL-1R), virus linfotrópico de linfocitos B humanos (HTLV)-1, proteína Tax y lipopolisacárido (LPS) (Malinin, N.L. y col., 1997. *Nature* 385:540-4; Sylla, B.S. y col., 1998. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10106-11; Darnay, B.G. y col., 1999. *J Biol Chem.* 274:7724-31; Lin, X. y col., 1999. *Immunity* 10:271-80; Geleziunas, R. y col., 1998. *Mol Cell Biol.* 18:5157-65). La alteración dirigida del gen NIK (Yin, L. y col., 2001. *Science* 291:2162-5), y el estudio de la cepa de ratón con "alinfoplasia" (aly) que es portadora de una mutación puntual natural de sentido erróneo Gly855Arg en NIK (Shinkura, R. y col., 1999. *Nat Genet.* 22:74-7), reveló que NIK tiene un papel esencial en el desarrollo de los órganos linfoides. Tanto los ratones aly/aly como los que tienen el gen NIK desactivado, manifiestan una ausencia sistémica de los ganglios linfáticos y las placas de Peyer, unas estructuras esplénicas y tímicas desorganizadas, e inmunodeficiencia cuyos rasgos más destacados son niveles bajos de Ig en suero y carencia de rechazo a trasplantes (Shinkura, R. y col., 1999. *Nat Genet.* 22:74-7). Estas anomalías reflejan aparentemente una señalización aberrante de una variedad de receptores. Las carencias evolutivas de los ratones mutantes en NIK, se asemejan a aquellas encontradas en ratones carentes del receptor de LT- β (LT-PR), sugiriendo que NIK también participa en la señalización por este receptor en particular. Se pudo demostrar que el deterioro de la capacidad proliferativa de los linfocitos B en los ratones aly/aly se corresponde con una respuesta insuficiente de estas células frente a LPS y el ligando de CD40 (CD40L; Garceau, N. y col., 2000. *J. Exp. Med.* 191:381-6), y la presencia de cantidades excesivas de células BI en la cavidad peritoneal de ratones podría atribuirse a defectos en el autoguiado de células peritoneales al sistema tisular linfático asociado al intestino (GALT) como consecuencia de una señalización insuficiente del receptor de quimiocina en el tejido linfoides secundario (Fagarasan, S. y col., 2000. *J. Exp. Med.* 191:1477-1486).

45 Un papel importante y general de NIK en la señalización de los receptores de citocinas ha sido mostrado recientemente en estudios realizados por Wallach y col., utilizando un sistema de dos híbridos, en donde se muestra que la cadena y del receptor de IL-2, o la "cadena y común", que es un componente de la señalización de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21, se asocia específicamente con NIK (documento PCT/IL 03/00317). Se observó que la hiperexpresión de la cadena y común potenciaba la activación de NF- κ B mediada por NIK, y que después de la estimulación de IL-2 o IL-15, NIK y los componentes del señalosoma se unían a la cadena y común. Estos resultados indican, por tanto la participación de NIK en la señalización a través de la gran variedad de receptores de citocinas que componen la cadena y común, como una subunidad de la señalización.

Aparte de estas y otras contribuciones a la regulación del desarrollo y la función del sistema inmunológico, NIK también está implicado en la regulación de diversas funciones no inmunes. Los ratones *aly/aly* (aunque no los que tienen el gen NIK desactivado) muestran un desarrollo insuficiente de la glándula mamaria (Miyawaki, S. y col., 1994. Eur. J. Immunol. 24:429-34). Por otra parte, estudios *in vitro* han implicado a NIK en la señalización que conduce a la diferenciación celular del músculo esquelético (Canicio, J. y col., 2001. J Biol Chem. 276:20228-33), y a la supervivencia y la diferenciación de las neuronas (Foehr, E.D. y col., 2000. J Biol Chem. 275:34021-4).

Coincidiendo con el papel sugerido de NIK como mediador de la activación de NF- κ B, los fibroblastos obtenidos a partir de ratones *aly/aly* y ratones con el gen de NIK desactivado, no lograban activar NF- κ B como respuesta a la activación de LT- β R. Por otra parte, la regulación a la alza con LT- β R de VCAM-1, que ocurre a través de la activación de NF- κ B, es anormal en fibroblastos embrionarios de ratón *aly/aly* (MEFs; Matsumoto, M. y col., 1999. J Immunol. 163:1584-1591). La fosforilación insuficiente de I κ B también se ha observado en la respuesta de los linfocitos B *aly/aly* a la ligación de CD40. En contraste, en las células dendríticas de estos ratones, la fosforilación inducida por CD40 de I κ B parecía normal (Garceau, N. y col., 2000. J. Exp. Med. 191:381-6). Las células peritoneales *aly/aly* también son incapaces de responder a la quimiocina SLC con un aumento de la actividad de NF- κ B (Fagarasan, S. y col., 2000. J. Exp. Med. 191:1477-86).

La evaluación del patrón de especies de NF- κ B expresadas en los órganos linfoides de ratones *aly/aly*, indicaba que, además de su papel en la regulación de complejo(s) NF- κ B, constituido(s) por proteínas Rel (A + p50) e I κ B, NIK también participa en el control de la expresión/activación de otras especies de NF- κ B. En particular, linfocitos de *aly/aly* carecen de 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 que sugiere una carencia en la conversión de p100 a p52 (Yamada, T. y col., 2000. J Immunol. 165:804-12). En efecto, se ha observado que NIK participa en la fosforilación específica del sitio de p100. Ambas conducen directamente a la fosforilación de IKK α , que a su vez fosforila a p100. Esta fosforilación sirve como un disparador molecular para la ubiquitinación y el procesamiento activo de p100 para formar p52. Se encontró que esta actividad procesadora de p100 era anulada por la mutación *aly* (Xiao, G. y col., 2001. Mol Cell 7:401-9; Senftleben, U. y col., 2001. Science 293:1495-9).

En vista de la homología estructural de NIK con MAP3Ks, se han realizado algunos intentos para explorar la implicación de NIK en las cascadas de ERK, JNK y p38, las otras tres cascadas principales de proteína cinasa que se sabe que implican a MAP3Ks (Akiba, H. y col., 1998. J Biol Chem. 273:13353-8). Se ha observado que NIK está implicada en la cascada de ERK en células de feocromocitoma PC12 (Foehr, E.D. y col., 2000. J Biol Chem. 275:34021-4). Asimismo se ha presentado la evidencia de que, en ciertas células, NIK puede participar en la señalización para la fosforilación de Jun, la diana aguas abajo de la cascada de JNK, de un modo que es independiente de esta cascada concreta (Akiba, H. y col., 1998. J Biol Chem. 273:13353-8; Natoli, G. y col., 1997. J Biol Chem. 272:26079-82). En general, estos descubrimientos indican que NIK sirve en efecto como mediador de la activación de NF- κ B, pero también puede servir para otras funciones, y que ejerce estas funciones de una manera específica de la célula y del receptor.

De manera similar a otras MAP3Ks, NIK puede ser activada como consecuencia de la fosforilación del "bucle de activación" dentro de la molécula de NIK. De hecho, la mutación de un sitio de fosforilación dentro de este bucle (Thr559) inhibe la activación de NF- κ B después de la hiperexpresión de NIK (Lin, X. y col., 1999. Immunity 10:271-80). Además, la actividad de NIK parece estar regulada a través de la capacidad de las regiones aguas arriba y aguas abajo de su motivo cinasa para unirse entre sí (Lin y col. Molec. Cell Biol. (18) 10 5899-5907, 1998). Se ha observado que la región C-terminal de NIK aguas abajo de su resto cinasa es capaz de unirse directamente a IKK α (Regnier, C.H. y col., 1997. Cell 90:373-83), así como a p100 (Xiao, G. y Sun, S.C., 2000. J Biol Chem. 275:21081-5) y a TRAF2 (Malinin, N.L. y col., 1997. Nature 385:540-4). Estas interacciones son aparentemente necesarias para el funcionamiento de NIK en la señalización de NF- κ B. La región N-terminal de NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD), que se compone de un motivo básico (BR) y un motivo de repetición rico en prolinas (PRR) (Xiao, G. y col., 2001. Mol Cell 7:401-9). 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 espontáneamente oligómeros en los que estas uniones de las regiones N-terminal con C-terminal en cada molécula de NIK están aparentemente desorganizadas, y presentan un elevado nivel de actividad constitutiva (Lin, X. y col., 1999. Immunity 10:271-80). La unión de la región C-terminal de NIK a TRAF2, proteína adaptadora asociada al receptor de TNF, así como a otras TRAFs, (Malinin, N.L. y col., 1997. Nature 385:540-4; Rothe, M. y col., 1994. Cell 78:681-92; Takeuchi, M. y col., 1996. J Biol Chem. 271:19935-42) participa muy probablemente en la activación de NF- κ B a través de 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 observado que es capaz de fosforilar Ser176 en el bucle de activación de IKK α , para activar de este modo esta molécula (Ling, L. y col., 1998. Proc Natl Acad Sci USA. 95:3792-7). En consonancia con este modo de acción, estudios sobre los mecanismos responsables de la activación insuficiente de NF- κ B a través de LT- β R en MEFs *aly/aly*, han indicado que la mutación de NIK anula la activación del señalosoma de IKK y la consiguiente fosforilación de I κ B (Matsushima, A. y col., 2001. J. Exp. Med. 193:631-6). La capacidad de NIK para unirse a p100 directamente a través de su región C-terminal y fosforilarla, sugiere que p100 sirve como un sustrato directo de NIK (Xiao, G. y Sun, S.C., 2000. J Biol Chem. 275:21081-5). Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido 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. y col., 2001. *Science* 293:1495-9).

Por lo tanto, la activación de moléculas de NF- κ B a través de NIK representa un punto de control decisivo para la regulación de la actividad de NF- κ B.

5 Tal y como se describió anteriormente, la alteración de la regulación de la actividad de NF- κ B está asociada con la patogénesis de diferentes enfermedades humanas graves, tales como numerosas enfermedades cancerígenas y enfermedades asociadas con respuestas inmunes patológicas (revisada por Yamamoto y Gaynor, 2001. *J Clin Invest.* 107:135-142). Por ejemplo, la activación de la ruta de NF- κ B está implicada principalmente 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.* 18:621-63), y la enfermedad inflamatoria del intestino. Además, una regulación alterada de NF- κ B parece estar implicada en la patogénesis de otras enfermedades, tales como la aterosclerosis (Collins y Cybulsky, 2001. *J Clin Invest.* 107:255-64; Leonard, W.J. y col., 1995. *Immunol Rev.* 148:97-114) y la enfermedad de Alzheimer (Mattson y Camandola 2001. *J Clin Invest.* 107:247-54; Lin, X. y col., 1999. *Immunity* 10:271-80), en donde la respuesta inflamatoria está implicada al menos parcialmente.

15 Varias líneas de investigación indican que la activación con NF- κ B de genes de citocinas es un factor importante en la patogénesis del asma, que se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias y la regulación alterada de muchas citocinas y quimiocinas en el pulmón (Ling, L. y col., 1998. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:3792-7). Las citocinas, como TNF, que activan NF- κ B, están en número elevado en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y contribuyen a cambios inflamatorios crónicos y la hiperplasia sinovial observada en las articulaciones de estos pacientes (Malinin, N.L. y col., 1997. *Nature* 385:540-4). Administración de anticuerpos dirigidos contra TNF o un receptor truncado de TNF que se une a TNF, puede mejorar notablemente los síntomas de pacientes con artritis reumatoide.

25 Aumentos en la producción de citocinas proinflamatorias tanto por linfocitos como por macrófagos también han sido implicados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias del intestino, que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Matsumoto, M. y col., 1999. *J Immunol.* 163:1584-1591). La activación de NF- κ B se observa en muestras de biopsia de la mucosa de pacientes con enfermedad activa de Crohn y colitis ulcerosa. El tratamiento de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino con esteroides, disminuye la actividad de NF- κ B en muestras de biopsia y reduce los síntomas clínicos. Estos resultados indican que la estimulación de la ruta de NF- κ B está implicada en la respuesta inflamatoria mejorada, asociada con estas enfermedades.

30 La aterosclerosis es desencadenada por numerosas agresiones al endotelio y a la musculatura lisa de la pared del vaso dañado (Matsushima y col. 2001). Un gran número de factores de crecimiento, citocinas, y quimiocinas liberadas desde las células endoteliales, la musculatura lisa, los macrófagos y los linfocitos está implicado en este proceso inflamatorio crónico y fibroproliferativo (Matsushima A. y col. 2001 *J Exp Med* 193:631-6)). La regulación a través de NF- κ B de los genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el control de la proliferación celular tiene probablemente un papel importante en el inicio y el progreso de la aterosclerosis.

35 Tal y como se ha descrito anteriormente, anomalías en la regulación de la ruta de NF- κ B han mostrado estar implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, la inmunoreactividad de NF- κ B se encuentra principalmente en los tipos de placas neuríticas tempranas y cerca de las mismas, en la enfermedad de Alzheimer, mientras que los tipos de placas maduras muestran una actividad muy reducida de NF- κ B (Mercurio F. y Manning A.M., 1999. *Curr Opin Biol Cell.* 11:226-32). Por lo tanto, la activación de NF- κ B está en el inicio de las placas neuríticas y la apoptosis neuronal durante las primeras fases de la enfermedad de Alzheimer. Estos datos indican por lo tanto, que la activación de la ruta de NF- κ B desempeña un papel en una serie de enfermedades que tienen un componente inflamatorio implicado en su patogénesis.

45 Además de un papel en la patogénesis de enfermedades asociadas con respuestas inmunes con una regulación alterada, la hiperactivación o la activación constitutiva de la ruta de NF- κ B, también ha sido implicada en la patogénesis de diversos cánceres humanos. La activación anormalmente alta y/o constitutiva de la ruta de NF- κ B se observa con frecuencia en una variedad de cánceres humanos, que incluyen leucemias, linfomas y tumores sólidos (Miyawaki, S. y col., 1994. *Eur. J. Immunol.* 24:429-34). Estas anomalías dan como resultado unos niveles anormales y/o constitutivamente elevados de NF- κ B en el núcleo de una variedad de tumores, que incluyen el de mama, ovario, próstata y cáncer de colon. La mayoría de estos cambios son probablemente debidos a alteraciones en proteínas reguladoras que activan rutas de señalización que conducen a la activación de la ruta de NF- κ B. Sin embargo, mutaciones que inactivan las proteínas I κ B, además de la amplificación y la reorganización de los genes que codifican miembros de la familia de NF- κ B, pueden dar lugar al aumento de los niveles nucleares de NF- κ B observados en algunos tumores (Emmerich y col. *Blood* 1 de noviembre; 94(9):3129-34, 1999).

55 Por tanto, tal y como se ha descrito anteriormente, NIK es decisiva para la activación de NF- κ B, una estrategia potencialmente poderosa para la regulación de la activación de NF- κ B, y por lo tanto para el tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad de NF- κ B con una regulación alterada, implica la identificación de anticuerpos capaces de unirse específicamente a NIK o a una de sus porciones específicas, y evitar de este modo o inhibir la activación de NF- κ B a través de NIK. En virtud de que permitan la detección específica de NIK o de una de sus porciones específicas, dichos anticuerpos permitirían adicionalmente la caracterización de procesos/estados norma-

les/patológicos, biológicos/bioquímicos que implican a NIK o a una porción específica de la misma.

Se han propuesto varios enfoques en la técnica anterior para intentar utilizar anticuerpos para la unión específica a NIK (ver Tabla 2).

5 Un enfoque ha intentado el uso de anticuerpos IgG monoclonales de ratón para la unión específica a los residuos de aminoácidos 700-947 de la región carboxi-terminal del polipéptido NIK.

Otro enfoque ha intentado emplear anticuerpos policlonales de cabra para la unión específica a la región amino-terminal de la proteína NIK.

Aún otro enfoque ha intentado utilizar anticuerpos policlonales de conejo para la unión específica a los residuos de aminoácidos 700-947 o 931-947 de la región carboxi-terminal del polipéptido NIK.

10 Sin embargo, todos los enfoques mencionados anteriormente tienen desventajas importantes. Los anticuerpos de la técnica anterior no se pueden unir a NIK, o a una porción específica de la misma, con una afinidad, especificidad y/o versatilidad óptimas. Por ejemplo, los anticuerpos de la técnica anterior que se unen a NIK son incapaces de unirse específicamente a cualquier porción del dominio cinasa de NIK, o de unirse específicamente a numerosas porciones de las regiones carboxi y amino-terminales, tales como porciones de las mismas que participan en la actividad de
15 NIK. Por lo tanto, ya que la activación de NF- κ B implica acontecimientos de fosforilación mediados por NIK, los anticuerpos de la técnica anterior no son adecuados para evitar o inhibir la actividad cinasa de NIK. Preparaciones de anticuerpos policlonales de la técnica anterior se ven obstaculizadas además por haber sido producidas contra segmentos de NIK de un tamaño subóptimo, y por lo tanto mediante la inclusión de anticuerpos específicos para una amplia gama subóptima de epítopos (por ejemplo, véase la Tabla 2, abajo). Por otra parte, los anticuerpos de la técnica anterior de la región anti-amino-terminal/no obtenidos a partir de ratones, no pueden unirse específicamente a li-
20 gandos de anticuerpos anti-ratón, que constituyen el tipo más utilizado de reactivos secundarios para marcar, utilizados en los ensayos de detección basados en anticuerpos. De este modo, los anticuerpos de la técnica anterior de la región anti-amino-terminal no son óptimos para detectar la región amino-terminal de NIK.

25 Por ello, todos los enfoques de la técnica anterior no han podido proporcionar anticuerpos capaces de unirse a NIK o a una porción específica de la misma, con una afinidad, especificidad y/o versatilidad que permitan una regulación óptima de la actividad de NIK, y por tanto de la actividad de NF- κ B, y/o que permitan una detección óptima de NIK.

Por consiguiente, existe una necesidad ampliamente reconocida de anticuerpos que carecen de las limitaciones anteriores, y que sería muy ventajoso tenerlos.

Sumario de la invención

30 La invención se refiere a un anticuerpo o a una preparación de anticuerpo que comprende anticuerpos policlonales, y/o fragmentos F(ab')₂ de los mismos en donde los anticuerpos se obtienen contra un péptido que consiste en SEQ ID NO: 7, del dominio cinasa de NIK.

En una realización, los anticuerpos son de la clase IgG y/o los fragmentos de anticuerpos son F(ab')₂.

35 En un aspecto de la invención, dicho anticuerpo o preparación de anticuerpo es además capaz de detectar específicamente NIK o una muteína, un derivado funcional, una fracción activa, un derivado permutado circularmente, una sal o una porción de la misma, por ejemplo, mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, inmunoprecipitación, y/o es capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula NIK.

Tal y como se describe en esta memoria, dicho anticuerpo y/o preparación de anticuerpo es capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula NIK.

40 En una realización, la invención se refiere a una preparación que comprende anticuerpos policlonales y/o fragmentos de los mismos que son capaces de unirse específicamente a NIK o a una muteína, un derivado funcional, una fracción activa, un derivado permutado circularmente o una sal de la misma, el anticuerpo preparado inmunizando un mamífero con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos, o una porción de dicha secuencia de amino-
45 ácidos expuesta en SEQ ID NO: 7, es preferiblemente capaz de detectar y/o inhibir otras especies de NIK, tales como NIK de múrido.

Una realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal generado por el clon del hibridoma Pep 7-81.1 depositado en la CNCM con el n° I-3092, y los hibridomas respectivos que generan los anticuerpos.

También se describe en esta memoria una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, una preparación de anticuerpo o un anticuerpo de acuerdo con la invención.

50 Esta memoria descriptiva también describe un método para regular una actividad bioquímica de una molécula NIK, comprendiendo el método poner en contacto la molécula NIK con una preparación de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención.

5 En una realización adicional, la invención se refiere a una composición de materia (en inglés, "composition-of-matter") que comprende un sustrato, por ejemplo, una matriz de cromatografía de afinidad, un hidrato de carbono (por ejemplo, agarosa, sefarosa y celulosa), perlas, una resina o una superficie de plástico, fijada covalentemente a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos, exponiéndose dicha secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 7 para capturar selectivamente el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al antígeno diana.

También se describe en esta memoria un método para el tratamiento de una enfermedad causada o agravada por la actividad de NIK, que comprende la administración de un anticuerpo o una preparación de acuerdo con la invención, a un individuo que lo requiera.

10 También se describe el uso de un anticuerpo o de una preparación de acuerdo con la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada o agravada por la actividad de NIK.

En otra realización adicional, la invención se refiere a un método para preparar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención que comprende hacer crecer el clon de hibridoma Pep 7-81.1 en un medio líquido o en el abdomen de un mamífero, para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.

15 En otra realización, la invención se refiere a un método para preparar un anticuerpo monoclonal que comprende inmunizar un mamífero con un péptido, que es parte de una secuencia de aminoácidos de NIK, y es SEQ ID NO: 7.

20 En otra realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para la purificación de una proteína que se une a NIK, que comprende poner en contacto una muestra que contiene NIK y la proteína que se une a NIK, con el anticuerpo o la preparación de anticuerpo de la invención, inmunoprecipitar conjuntamente NIK y la proteína que se une a NIK, lavar el complejo inmune producido y recuperar la proteína que se une a NIK a partir del complejo inmune, utilizando un péptido competitivo obtenido a partir de NIK.

También se describe en esta memoria el uso de una preparación de anticuerpo o de un anticuerpo de acuerdo con la invención, para la purificación inmune de NIK o una muteína, un derivado funcional, una fracción activa, un derivado permutado circularmente o una sal de la misma.

25 La invención también se define por las reivindicaciones.

Breve descripción de los Dibujos

30 La invención se describe en esta memoria, solamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específica a los dibujos en detalle, se recalca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de ilustrar las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más precisión que la que es necesaria para una comprensión fundamental de la invención, siendo la descripción junto con los dibujos evidentes para los expertos en la técnica de cómo pueden realizarse en la práctica las diversas formas de la invención.

35 En los dibujos:

La Fig. 1 muestra un diagrama esquemático que representa el polipéptido de NIK, las regiones del mismo y la posición en el mismo de los péptidos obtenidos a partir de NIK, utilizados para las inmunizaciones.

40 La Fig. 2 muestra un diagrama de secuencia que representa la secuencia de aminoácidos de NIK humana (SEQ ID NO: 21). Los péptidos obtenidos a partir de NIK utilizados para las inmunizaciones están subrayados (Nota: los péptidos que muestran que no tienen un residuo Cys en el extremo N-terminal se sintetizaron con un residuo Cys adicional en el extremo N-terminal y se utilizaron para las inmunizaciones como tales).

45 La Fig. 3 muestra una fotografía de un análisis de inmunotransferencia Western que describe la capacidad de los sueros de ratones inmunizados con los péptidos indicados obtenidos a partir de NIK, para detectar eficientemente NIK en lisado de proteína procedente de células transfectadas con PCS3MTNIK. El anticuerpo anti-marcador myc se utilizó como testigo positivo.

50 Las Figs. 4a-d muestran fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que representan la capacidad de los sueros de ratones inmunizados con los péptidos indicados obtenidos a partir de NIK, para detectar NIK con una sensibilidad muy elevada en lisado de proteína inmunoprecipitada con proteína G procedente de células transfectadas con PCS3MTNIK. Los ensayos mostrados en las Figuras 4a-d se realizaron en paralelo y el anticuerpo anti-marcador myc se utilizó como testigo positivo (Figura 4d).

La Fig. 5 muestra un histograma que representa la capacidad del suero de ratones inmunizados con los péptidos indicados obtenidos a partir de NIK para detectar NIK en lisado de proteína procedente de células transfectadas con pHis-NIK, mediante ELISA. Un anticuerpo anti-marcador His se utilizó como testigo positivo. Las flechas indican la proteína de fusión NIK-myc.

La Fig. 6 muestra fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que representa la capacidad del material sobrenadante de hibridoma para detectar NIK en un lisado de proteína procedente de células transfectadas con PCS3MTNIK. El material sobrenadante de cultivos de tres hibridomas Pep 7-81.1, Pep 11-355.8 y Pep 12-629-62-18 se analizaron mediante inmunotransferencia Western para detectar NIK marcado con myc. Las transferencias Western se investigaron con el material sobrenadante del cultivo del hibridoma indicado con una dilución de 1:500.

La Fig. 7 muestra fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que representa la capacidad del anticuerpo monoclonal Pep 7-81.1, Pep 11-355.8, Pep 12-629-62-18 para detectar NIK en lisado de proteínas inmunoprecipitadas con proteína G procedentes de células transfectadas con PCS3MTNIK. Inmunoprecipitación: lisado de 293-T que expresa la proteína NIK marcada con myc, se utilizó como sustrato para estudiar la capacidad de inmunoprecipitación de los anticuerpos monoclonales indicados. Pista 1: anticuerpo Pep 7-81.1 purificado por afinidad a partir de líquido ascítico, pista 2: anticuerpo Pep 12-629-62-18, pista 3: anticuerpo Pep 11-355.8, pista 4: anticuerpo Pep 7-81.1, pista 5: anti-myc, pista 6: anticuerpo Pep 12-629.62.25 procedente de ascitis, pista 7: testigo de IgG de ratón.

La Fig. 8 muestra la detección de NIK endógena en células Ramos mediante el anticuerpo monoclonal anti NIK 81.

La Fig. 9 muestra la detección de NIK de ratón hiperexpresada en células HeLa con anticuerpo monoclonal anti NIK 81.

Descripción de las realizaciones preferidas

Reduciendo la presente invención a la práctica, se generó inesperadamente una preparación de anticuerpo que era capaz de: (i) unirse específicamente a NIK, o una porción específica de la misma, tal como la región cinasa o a una porción específica de la misma, o a una porción específica de la región amino o carboxi-terminal; o (ii) unirse específicamente de forma óptima a NIK, o a una porción específica de la misma, tal como la región cinasa o a una porción específica de la misma, o a una porción específica de la región amino o carboxi-terminal. La capacidad de la preparación de anticuerpo de la presente invención para unirse específicamente a la totalidad de la región cinasa o a cualquier porción específica de la misma, o para unirse específicamente a cualquiera de varias porciones específicas de las regiones amino o carboxi-terminal de NIK, es única en relación con todos los anticuerpos de la técnica anterior.

Por lo tanto, en marcado contraste con los anticuerpos de la técnica anterior, la preparación de anticuerpo descrita en esta memoria se puede utilizar para detectar de manera óptima NIK o una porción específica de la misma. El anticuerpo de la invención también puede utilizarse para coimmunoprecipitar y aislar factores reguladores que se unen a NIK.

El experto en la técnica apreciará que una preparación de anticuerpo, tal como la de la presente invención, se puede tratar mediante métodos convencionales, por ejemplo, tal y como se describen más adelante, de modo que se genera una preparación de uno o varios tipos de fragmentos de anticuerpo que tienen características de unión al antígeno esencialmente idénticas a las de la preparación de anticuerpo sin tratar.

Así, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una preparación de un anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una secuencia de aminoácidos, o a una porción de la misma, en donde la secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID NO: 7.

Preferiblemente, la unión de la porción del péptido con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7, o de una porción de la misma. Más preferiblemente, la unión de la porción del péptido de la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7.

La expresión "una porción de un péptido" se define como al menos un tripéptido de SEQ ID NO: 22.

La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20 o 22, o una porción de dicha secuencia de aminoácidos se denomina en lo sucesivo "antígeno diana".

Tal y como se describe de aquí en adelante, la preparación se puede utilizar para regular de forma óptima una actividad bioquímica de una cinasa que induce NF- κ B, (NIK)/MAP3K14, tal como una actividad de cinasa, y por lo tanto puede utilizarse para regular de forma óptima la activación de NF- κ B, y por ello se puede utilizar para el tratamiento óptimo de una enfermedad asociada con una alteración de la regulación de la actividad de NF- κ B. Además, la preparación se puede utilizar únicamente para la detección de la región cinasa de NIK, o de cualquiera entre diversas porciones específicas de la misma, y se puede utilizar para detectar de manera óptima cualquiera entre varias porciones específicas de la región amino o carboxi-terminal de NIK. Como tal, la preparación se puede utilizar para caracterizar de manera óptima aspectos de procesos/estados normales/patológicos, biológicos/bioquímicos que implican a NIK o a porciones específicas de la misma.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "tratar" cuando se relaciona con una enfermedad, se refiere a la prevención de la aparición de una enfermedad, al alivio de una enfermedad, a la atenuación o la eliminación de los síntomas de una enfermedad, a la detención o anulación de la progresión de una enfermedad, o la curación de una en-

fermedad.

Dependiendo de la aplicación y del objetivo, la preparación descrita en esta memoria puede comprender ventajosamente cualquiera entre diversas combinaciones de poblaciones de anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo, y puede comprender ventajosamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo caracterizado por cualquiera entre diversas combinaciones de características estructurales y/o funcionales. Por ejemplo, la preparación puede comprender ventajosamente: (i) una población de anticuerpos y/o de fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente a cualquiera entre varias combinaciones de antígenos diana de la presente invención; (ii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a cualquier entre diversas porciones específicas de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 o 20; y/o (iii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo fijado a cualquiera entre diversas moléculas detectables.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de anticuerpo sustancialmente completa o intacta.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula que comprende una porción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno, un determinante antigénico o un epítipo.

Tal y como se describe en la sección de Ejemplos, a continuación:

(i) la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6 representa los residuos de aminoácidos 60-76, 86-99, 135-150, 215-228, 363-378 o 385-398 de NIK humana, respectivamente, y está localizada en la región amino-terminal de NIK humana;

(ii) la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 22 representa los residuos de aminoácidos 401-681 de NIK humana que se corresponden a la región cinasa de NIK humana y cerca de la región cinasa; y

(iii) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12 representa los residuos de aminoácidos 405-420, 427-441, 509-523, 605-619, 635-650 o 666-681 de NIK humana, respectivamente, y se localiza en la región cinasa o cerca de la región cinasa de NIK humana; y

(iv) SEQ ID NO: 12, 13, 15, 17, 18, 19 o 20 representa los residuos de aminoácidos, 696-712, 752-767 836-851, 871-885 o 904-917 de NIK humana, respectivamente, y está localizada en la región carboxi-terminal de NIK humana.

Preferiblemente, la preparación es capaz de unirse al antígeno diana, con una afinidad máxima.

Reduciendo la presente invención a la práctica, se generaron inesperadamente diferentes preparaciones de anticuerpos con las siguientes propiedades:

anticuerpos que tienen capacidad de unión a la "región flanqueante del dominio cinasa de NIK", por ejemplo, a los péptidos de la región N-terminal del dominio cinasa y, preferentemente, a los péptidos 405-420 (SEQ ID NO: 7) y anticuerpos que tienen una capacidad de unión a péptidos en o cerca de la región C-terminal del dominio cinasa, en particular, a los péptidos 635-650 (SEQ ID NO: 11) y 666-681 (SEQ ID NO: 12) o que tienen capacidad de unión a una porción de dichos péptidos, son capaces de detectar de manera NIK eficazmente mediante análisis de inmunotransferencia Western.

Anticuerpos que tienen capacidad de unión a péptidos de la región que se une a ATP de NIK y preferiblemente al péptido 427-441 (SEQ ID NO: 8), o que tienen capacidad de unión a una porción de dichos péptidos, son capaces de detectar NIK de manera eficaz mediante ELISA.

Anticuerpos que tienen capacidad de unión a los péptidos cerca y al comienzo de la región C-terminal, por ejemplo, dentro de los residuos 635-767, en particular a los péptidos 635-650 (SEQ ID NO: 11) y 666-681 (SEQ ID NO: 12), 696-712 (SEQ ID NO: 13) y 752-767 (SEQ ID NO: 15), o que tienen capacidad de unión a una porción de dichos péptidos, son capaces de inmunoprecipitar NIK de manera eficaz.

Anticuerpos que tienen capacidad de unión a péptidos en o cerca de la región C-terminal del dominio cinasa, en particular a los péptidos 635-650 (SEQ ID NO: 11) y 666-681 (SEQ ID NO: 12) o que tienen capacidad de unión a una porción de dichos péptidos, son capaces de detectar NIK de manera eficiente mediante análisis de inmunotransferencia Western e inmunoprecipitación.

En general, una preparación tal y como se describe en esta memoria, que es capaz de unirse al antígeno diana con una afinidad máxima, permitirá una regulación a la baja óptima de una actividad bioquímica mediada o asociada con el antígeno diana. De manera similar, una preparación de la presente capaz de unirse específicamente al antígeno diana con una afinidad máxima, permitirá generalmente la detección del antígeno diana con una sensibilidad óptima.

En virtud de la capacidad descrita anteriormente de la preparación para unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, en particular, en virtud de la capacidad única de la preparación para unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, localizado en una región funcional de NIK, la preparación se puede

utilizar para regular a la baja una actividad bioquímica de NIK. En particular, en virtud de la capacidad única descrita anteriormente de la preparación para unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, situado en la región cinasa de NIK, la preparación se puede utilizar para regular a la baja de forma óptima la actividad cinasa de NIK. Se apreciará que, puesto que tal actividad cinasa es crucial para activar el factor nuclear (NF)-κB, tal y como se ha descrito anteriormente, una preparación tal y como se describe en esta memoria que es capaz de regular a la baja de forma óptima tal actividad cinasa, se puede utilizar para regular a la baja de forma óptima la actividad de NF-κB.

Las proteínas NF-κB es una familia de proteínas que comparten un dominio de 300 aminoácidos, el "dominio de homología Rel". El dominio de homología Rel es mediador en la unión al ADN, la dimerización y el transporte nuclear de proteínas NF-κB. Además del dominio de homología Rel, algunos miembros de la familia NF-κB también contienen un dominio de transactivación (por ejemplo, c-Rel, RelB y p65). Los miembros de NF-κB, p50 y p52, se producen tras la activación mediante lisis de los precursores inactivos p105 y p100, respectivamente. p50 y p52c tienen propiedades de dimerización y de unión al ADN, pero no dominios de transactivación fuertes. La generación diferencial de estas proteínas, su capacidad para heterodimerizarse con diferentes miembros de la familia y la interacción de estas proteínas con diferentes componentes del aparato de la transcripción, contribuyen a los diversos efectos para la activación de la ruta de NF-κB. NIK no afecta a todas las especies de NF-κB, sino sólo a especies de NF-κB específicas, por ejemplo, induce la degradación de p100 y la generación de p52c, como respuesta a inductores específicos, p. ej., linfotoxina. La modulación de NIK, por ejemplo, utilizando los anticuerpos de la invención, por lo tanto, es probable que afecte a aspectos específicos de las implicaciones patológicas de la activación de NF-κB. Esto es una ventaja ya que la inhibición no específica general de NF-κB es peligrosa, por ejemplo, puede dar como resultado una apoptosis extendida en el hígado.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "regular a la baja" cuando se relaciona con una actividad bioquímica se refiere a la prevención, reducción o inhibición de tal actividad bioquímica.

Cuando se emplea para inhibir una actividad bioquímica de NIK, la preparación debe ser capaz de unirse específicamente a 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 cinasa de NIK, la preparación debe ser capaz de unirse específicamente a un número máximo de antígenos diana, situados dentro de las secuencias de aminoácidos de la región cinasa de NIK, indicadas en SEQ ID NO: 7. Mientras que una preparación tal y como se describe en esta memoria que es capaz de unirse específicamente sólo a un antígeno diana, situado dentro de una región funcional de NIK, tal como la región cinasa, se puede emplear para inhibir eficazmente una función bioquímica de NIK, tal como la actividad cinasa, asociada con esa región funcional, una preparación capaz de unirse específicamente a un número máximo de antígenos diana situados dentro de tal región funcional, regulará a la baja más eficazmente la actividad cinasa, debido a la interferencia con un número máximo de epítopos funcionales dentro de la región funcional.

Alternativamente, para inhibir la actividad cinasa de NIK, la preparación puede ser capaz ventajosamente de unirse específicamente a un número máximo de antígenos diana situados dentro de la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7.

En virtud de la capacidad descrita anteriormente de la preparación para unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, la preparación se puede utilizar para detectar NIK específicamente con una sensibilidad óptima, en comparación con los métodos de la técnica anterior, y se puede utilizar solamente para detectar NIK específicamente y a un antígeno diana, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

La preparación se puede utilizar para esencialmente cualquier aplicación que se beneficie de un reactivo capaz de unirse a un antígeno diana de la presente invención, con una afinidad óptima. Tales aplicaciones incluyen, por ejemplo, la purificación por afinidad, y por lo tanto, la identificación y la caracterización de ligandos específicos de NIK.

Tal y como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, una preparación de la presente invención capaz de unirse específicamente a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7, se puede utilizar para detectar específicamente, de acuerdo con las indicaciones descritas en esta memoria, la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7.

Preferiblemente, una preparación de la presente invención capaz de unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, se obtiene a partir de sueros de animales inmunizados con dicho antígeno diana (en lo sucesivo "antisueros"). Tal y como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos más adelante, un antisuero de la presente invención, capaz de unirse específicamente a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7, se puede generar mediante la inmunización de un mamífero con el antígeno diana de acuerdo con el protocolo establecido en esta memoria. Otras indicaciones para generar la preparación mediante la inmunización de un mamífero, se proporcionan más adelante.

Las indicaciones para obtener un polipéptido tal como el antígeno diana se proporcionan más adelante.

Una preparación de la presente invención capaz de unirse específicamente al antígeno diana descrito en esta memoria, se puede obtener agrupando un conjunto de preparaciones de la presente invención que son capaces colecti-

vamente de unirse específicamente al antígeno diana, en donde cada preparación de la agrupación se obtiene a partir de sueros de animales inmunizados con el antígeno diana.

Dependiendo de la aplicación y del objetivo, la preparación puede emplearse ventajosamente en forma de un antisuero no purificado, o se puede purificar de varias maneras antes del uso. Por ejemplo, la preparación se puede utilizar en forma de una: (i) preparación purificada de un anticuerpo de un isotipo específico, o un conjunto de isotipos; (ii) preparación purificada de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una porción específica de la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7; y/o (ii) preparación purificada de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo 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 sin purificar puede ser conveniente y satisfactoria para el uso en diversas aplicaciones. Por ejemplo, tal y como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos más adelante, un antisuero sin purificar de la presente invención, en particular, un antisuero sin purificar generado mediante inmunización con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7, se puede utilizar para detectar NIK eficazmente a través de un análisis de inmunotransferencia Western, y un antisuero sin purificar generado mediante inmunización con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 8, se puede utilizar para detectar NIK eficazmente a través de 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, en donde es deseable una gama de afinidades o especificidades, será ventajosa una preparación sin purificar de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención. Tal preparación sin purificar puede ser adecuada frecuentemente para una aplicación dada puesto que la heterogeneidad del anticuerpo policlonal o la mezcla de fragmentos de anticuerpo que contiene incluirán frecuentemente uno o varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen una afinidad/especificidad adecuada de la unión con el antígeno diana.

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

Tal y como se emplea en esta memoria, el término "individuo", se refiere a un ser humano.

Por ejemplo, una preparación de anticuerpo IgG de la presente invención se puede purificar ventajosamente a partir de un antisuero de la presente invención, usando la purificación por afinidad con proteína G, preferiblemente a través de la inmunoprecipitación con proteína-G. Tal y como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos que sigue, un antisuero de la presente invención obtenido a partir de un animal inmunizado con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 y purificado por inmunoprecipitación con proteína G de acuerdo con el protocolo expuesto en esta memoria, se puede utilizar para detectar con una sensibilidad óptima, a través de análisis por inmunotransferencia Western, la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7.

Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo purificado tal y como se describe en esta memoria que es capaz de unirse específicamente al antígeno diana, se puede utilizar ventajosamente para regular con una especificidad óptima una actividad bioquímica de NIK asociada con el antígeno diana. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención se pueden emplear ventajosamente para detectar el antígeno diana con una especificidad óptima. En particular, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse específicamente a un antígeno diana descrito en esta memoria, comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 7, se puede utilizar ventajosamente para la regulación de la actividad cinasa de NIK con una especificidad óptima. En general, para aplicaciones que se benefician de una reproducibilidad, normalización o precisión óptimas, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse específicamente al antígeno diana, serán generalmente óptimos en comparación con una preparación sin purificar de la presente invención.

Se puede lograr purificar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al antígeno diana, por ejemplo, mediante la purificación de una preparación de la presente invención, tal como un antisuero sin purificar de la presente invención, mediante cromatografía de afinidad utilizando un sustrato fijado covalentemente al antígeno diana. Un sustrato tal fijado al antígeno diana se puede utilizar, según la metodología convencional de cromatografía de afinidad, para capturar selectivamente el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al antígeno diana.

El sustrato es preferiblemente una matriz de cromatografía de afinidad. Una matriz de cromatografía de afinidad, que es un sustrato optimizado para realizar la cromatografía de afinidad, puede emplearse ventajosamente para conseguir una purificación por afinidad óptima.

Los sustratos que tienen diversas características estructurales y químicas se pueden emplear para realizar la purificación.

Preferiblemente, el sustrato comprende un hidrato de carbono o un derivado del mismo. Preferentemente, el hidrato de carbono es agarosa, sefarosa o celulosa.

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

Sustratos tales como perlas, resinas o superficies de plástico que comprenden hidratos de carbono tales como agarosa, sefarosa o celulosa, se utilizan habitualmente en la técnica para la práctica de la cromatografía de afinidad.

5 En la bibliografía técnica se proporciona una amplia guía para la puesta en práctica de la cromatografía de afinidad, tal como la que emplea de dichos sustratos (por ejemplo, véase: Wilchek M. y Chaiken I., 2000. *Methods Mol.* 147:1-6; Jack GW. *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* 49:467-80; Janson J.C. & Kristiansen T. en: "Packings and Stationary Phases in Chromatography Techniques" (compilador 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. y col., 1997. *Protein Expr Purif.* 11:1-16).

Alternativamente, una preparación de la presente invención se puede purificar utilizando una variedad de técnicas convencionales de purificación de proteínas, tales como, pero no se limitadas a las mismas, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

15 Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo tal y como se describe en esta memoria que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, con una afinidad deseada, se puede utilizar ventajosamente para conseguir un nivel deseado de regulación de una actividad bioquímica de NIK asociada con el antígeno diana. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención se pueden utilizar ventajosamente para detectar el antígeno diana con una sensibilidad deseada. En particular, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal y como se describe en esta memoria, que es capaz de unirse específicamente con una afinidad máxima a un antígeno diana de la presente invención, comprendido en la región cinasa de NIK, puede utilizarse ventajosamente para regular a la baja de forma óptima la actividad cinasa de NIK. De manera similar, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención capaz de unirse específicamente al antígeno diana, con una afinidad máxima, se puede utilizar ventajosamente para detectar el antígeno diana con una sensibilidad óptima.

25 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 antisuero sin purificar de la presente invención, se puede lograr, por ejemplo, mediante la purificación por cromatografía de afinidad de un antisuero sin purificar o, más preferiblemente de un antisuero purificado con proteína-G de la presente invención, empleando el antígeno diana como un ligando de afinidad, y mediante elución selectiva de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo unido al sustrato, bajo condiciones de rigurosidad controlada (por ejemplo, bajo condiciones de pH y/o de concentración de sal controladas). En particular, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención capaz de unirse al antígeno diana con una afinidad máxima, se puede obtener convenientemente por elución en condiciones de rigurosidad con eficacia máxima (por ejemplo, bajo condiciones de pH efectivo máximo o mínimo y/o concentración de sal máxima). Típicamente, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo puede unirse a un antígeno cognado fijado a un sustrato del mismo, bajo condiciones de pH y concentración salina fisiológicas, y dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede eluir típicamente desde el sustrato disminuyendo el pH a 2,5 o inferior, o bien aumentando el pH a 11 o superior.

40 El experto en la técnica apreciará que un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que tiene una afinidad caracterizada por una constante de disociación de hasta 10^{-12} para un antígeno cognado, puede obtenerse utilizando métodos comunes de la técnica.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la preparación puede comprender ventajosamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo fijado a cualquiera entre diversos tipos de moléculas detectables.

45 Una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo fijado a una molécula detectable, se puede utilizar para detectar el antígeno diana unido específicamente al anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo.

La preparación puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo fijado a cualquiera entre numerosos tipos de moléculas detectables, dependiendo de la aplicación y la finalidad.

Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y la finalidad, la molécula detectable puede ser ventajosamente un fluoróforo, una enzima, una molécula emisora de luz o un radioisótopo.

50 Preferiblemente, la molécula detectable es una enzima.

55 Una enzima se puede utilizar ventajosamente para permitir la detección del antígeno diana a través de cualquiera entre diversos métodos de detección basados en enzimas. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a los mismos, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA; por ejemplo, para detectar el antígeno diana en una solución), ensayo de quimioluminiscencia ligada a enzimas (por ejemplo, para detectar el complejo en una mezcla de proteínas separadas electroforéticamente), y ensayo histoquímico ligado a enzimas (por ejemplo, para detectar el complejo en un tejido fijado).

Tal y como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos más adelante, una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo fijado a una enzima, se puede utilizar para detectar NIK eficazmente a través de un análisis de inmunotransferencia Western o ELISA.

5 Se pueden emplear numerosos tipos de enzimas para detectar el antígeno diana, dependiendo de la aplicación y de la finalidad.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a las mismas, peroxidasa de rábano picante (HPR), β -galactosidasa y fosfatasa alcalina (AP).

Ejemplos de moléculas emisoras de luz incluyen el luminol.

Ejemplos de radioisótopos adecuados incluyen 125 yodo, 35 azufre, 3 hidrógeno, 32 fósforo, etc.

10 La molécula detectable puede estar fijada al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo de varias maneras, dependiendo de la aplicación y del objetivo, y de la naturaleza de las moléculas implicadas. En la bibliografía técnica se proporciona una amplia guía para la fijación de una molécula detectable a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo [por ejemplo, véase: "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Ed. Harlow, David Lane (compiladores), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); también, se hace referencia a las amplias directrices proporcionadas por la Sociedad Americana de Química, por ejemplo en: <http://www.chemistry.org/portal/Chemistry>]. Un experto en la técnica, tal como un químico, tendrá los conocimientos técnicos necesarios para poner en práctica adecuadamente tales técnicas de síntesis química.

20 En consecuencia, una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo fijado a una molécula detectable, se puede utilizar para detectar de manera eficaz y única el antígeno diana en, esencialmente, cualquier contexto.

La preparación de anticuerpo de la invención puede ser utilizada para la purificación inmune de NIK o una porción de la misma, preferiblemente, anticuerpos de la invención capaces de inmunoprecipitar NIK de forma eficaz.

En una realización preferida, se puede utilizar un anticuerpo de la invención para la etapa de captura en la purificación de NIK o de una porción de la misma.

25 Dependiendo de la aplicación y los fines, la preparación puede ser ventajosamente una preparación de cualquiera entre varios tipos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento de anticuerpo es preferiblemente un $F(ab')_2$.

30 Un fragmento de anticuerpo tiene la ventaja de ser más pequeño que un anticuerpo parental a partir del cual se ha obtenido, a la vez que se conserva una especificidad de unión al antígeno diana sustancialmente idéntica, o ambas especificidad de unión y afinidad de unión, como el anticuerpo parental. Así, un fragmento de anticuerpo, por ser más pequeño que el anticuerpo parental, tendrá por ello generalmente una biodistribución y unas propiedades de difusión superiores (por ejemplo, sistémicamente *in vivo* o en tejidos aislados) que el anterior. Un fragmento de anticuerpo que carece sustancialmente de una región Fc, tal como una cadena sencilla Fv, Fab', Fab, $F(ab')_2$ o CDR, es ventajoso para aplicaciones que implican la exposición de la preparación a una molécula capaz de unirse específicamente a dicha región Fc, y en donde no se desea dicha unión. Típicamente, esto puede implicar una unión no deseada de una región Fc expuesta a un receptor Fc cognado, o a un componente del complemento que se une a Fc (por ejemplo, el componente del complemento C1q, presente en el suero). Los receptores de Fc se muestran en la superficie de numerosos tipos de células inmunes, que incluyen: APCs especializadas, como las células dendríticas; linfocitos B; y granulocitos como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos. Por ello, la ausencia de una región Fc en el fragmento de anticuerpo puede ser particularmente ventajosa para evitar una activación indeseada de células inmunes mediadas por el receptor de Fc, de o una cascada del complemento mediada por un componente del complemento, en particular cuando la preparación se administra *in vivo* a un individuo.

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

45 Una preparación de $F(ab')_2$ de la presente invención se puede obtener convenientemente utilizando métodos convencionales en la técnica, tratando una preparación de anticuerpo de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima pepsina. El producto resultante $F(ab')_2$ es una partícula 5S.

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

50 CDR es la región determinante de complementariedad de un anticuerpo y la región del anticuerpo que está en contacto con el antígeno.

Una preparación de Fab' tal y como se describe en esta memoria se puede obtener convenientemente utilizando métodos convencionales en la técnica, mediante el tratamiento de una preparación de anticuerpo de la presente inven-

ción, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima pepsina, seguido por reducción del F(ab')₂ resultante. Dicha reducción se puede efectuar usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, utilizando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de los enlaces disulfuro. Dicho tratamiento genera dos fragmentos monovalentes 3.5S Fab's y un fragmento Fc.

- 5 Una preparación de Fab puede obtenerse convenientemente utilizando métodos convencionales en la técnica, mediante el tratamiento de una preparación de anticuerpo de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima papaína para obtener la cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada, compuesta por los dominios variables y C_H1.

10 La CDR se puede generar, por ejemplo, tal y como se describe en el documento EP0585939 o como se describe por Strandberg y col. (Protein Eng. 2001 Ene; 14(1):67-74). La CDR descrita en esta memoria puede ser una CDR modificada, que tiene un mayor efecto sobre la modulación de NIK. Un ejemplo de los métodos de modificación de péptidos activos está descrito por Sawa y col. 1999 (J. Med. Chem. 42:3289-3299).

15 En la bibliografía técnica se proporciona una extensa guía para generar un fragmento de anticuerpo mediante tratamiento enzimático de un anticuerpo (por ejemplo, véase: Goldenberg, documento de patente de EE.UU. n° 4.036.945 y 4.331.647; Porter R.R., 1959. Biochem J. 73:119-126).

Una cadena sencilla Fv (también denominada en la técnica "scFv") es una molécula de cadena sencilla que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipéptido adecuado.

Una preparación de F(ab')₂, Fab', Fab o Fv de cadena sencilla se puede obtener mediante técnicas recombinantes.

20 Preferiblemente, la obtención de un fragmento de anticuerpo recombinante se efectúa mediante el aislamiento de ARNm de linfocitos B de animales inmunizados con el antígeno diana, generando un ADNc a partir del ARNm mediante RT-PCR, y utilizando el ADNc para construir una genoteca que presenta en fagos el fragmento del anticuerpo. Los linfocitos B se pueden aislar convenientemente a partir del bazo o, alternativamente, de la sangre, médula ósea o ganglios linfáticos del animal inmunizado.

25 Los fagos recombinantes que presentan un fragmento de anticuerpo que posee una propiedad de unión al antígeno diana deseable, se pueden seleccionar de la genoteca por enriquecimiento secuencial de los fagos que tienen tal propiedad de unión, a partir de un gran exceso de clones que no se unen. Esta selección se puede lograr utilizando cualquiera entre varias técnicas que incluyen el cribado del antígeno diana inmovilizado; cribado usando una elución específica; utilizando un antígeno biotinilado; purificación por afinidad sobre columnas; o cribado directo sobre las células. Después de la selección, los fagos que presentan fragmentos no específicos de anticuerpo se pueden eliminar por lavado y los fagos unidos, que son portadores de scFv que muestra la propiedad de unión al antígeno diana deseada, se eluyen y se amplifican mediante infección de *E. coli*. Una vez que se ha aislado un fago recombinante que presenta un fragmento de anticuerpo que tiene una propiedad de unión al antígeno diana deseada, la secuencia de polinucleótidos que codifica las regiones variables del fragmento de anticuerpo, se puede recuperar por la técnica de presentación en la superficie de fagos y clonar en un vector de expresión recombinante procariota o eucariota, utilizando una metodología convencional [por ejemplo, véase: "Current Protocols in Molecular Cloning", Ausubel y col. (compiladores), Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York, N.Y. (1989); Sambrook y col., más arriba y referencias asociadas]. Dicho vector de expresión procariótico puede ser utilizado para producir el fragmento purificado de anticuerpo recombinante en *E. coli* (por ejemplo, véase Studier y col., 1990. Methods in Enzymol. 185:60-89). Un vector de expresión eucariótico tal, se puede utilizar para transformar genéticamente una célula eucariótica para expresar el fragmento de anticuerpo recombinante.

45 En la bibliografía técnica se proporciona una amplia guía para la obtención y explotación de una genoteca para presentar en la superficie de fagos fragmentos de anticuerpo, a partir de ARNm de linfocitos B [por ejemplo, véase: Hoogenboom y col., 1998. Immunotechnology 4:1-20; Kand y col. 1991. Proc Natl Acad Sci USA. 88:4363; Barbas y col. 1991. Proc Natl Acad Sci USA. 88:7978; Garrard y col., 1991. Biotechnology 9:1373-1377; Hoogenboom y col., 1991. Nucleic Acids Res. 19:4133-4137; Sharon y col., 2000. Combinational Chemistry and High Throughput Screening 3:185-196; documentos de Patente de EE.UU. n° 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; documentos de solicitud PCT n° PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401; Brinkman y col., 1995. J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames y col., 1995. J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough y col., 1994. Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic y col., 1997. Gene 187 9-18; y Burton y col., 1994. Advances in Immunology 57:191-280; Pluckthun en: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moors (compiladores), Springer-Verlag, Nueva York, p. 269-315 (1994); Hoogenboom y col., 1998. Immunotechnology 4:1-20].

55 Se apreciará que la metodología descrita anteriormente se puede utilizar para obtener una preparación de fragmento de anticuerpo monoclonal que tiene esencialmente cualquier afinidad y/o especificidad de unión al antígeno diana deseada. Dicha preparación se puede utilizar en diversas aplicaciones que se benefician de un reactivo capaz de unirse al antígeno diana con las características de unión al antígeno diana definidas.

Puesto que un Fab' es esencialmente similar en la estructura a un Fab, una preparación que comprende un Fab' se puede emplear esencialmente de manera intercambiable con una que comprende un Fab, en donde tales Fab y Fab' comprenden esencialmente las mismas regiones variables de la cadena pesada y ligera. Para aplicaciones, como suele ser el caso, que se benefician de una preparación de la presente invención que comprende un fragmento de anticuerpo capaz de unirse al antígeno diana, con una afinidad máxima, una preparación de $F(ab')_2$ de la presente invención puede ser superior a una preparación de Fab, Fab' o scFv, debido a la unión bivalente de un $F(ab')_2$ con el antígeno diana en comparación con la unión monovalente de un fragmento de anticuerpo.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, dependiendo de la aplicación y del objetivo, la preparación de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo puede proceder de cualquiera entre diversas especies de mamíferos

Una preparación de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo de la presente invención procedente de una especie deseada, se puede obtener a partir de suero del animal cuya especie se inmunizó con el antígeno diana.

Un anticuerpo tal puede ser monovalente, bivalente o multivalente, puede tener actividad de entrecruzamiento o no. Los anticuerpos utilizados de acuerdo con la presente invención pueden ser policlonales, tales como los anticuerpos producidos en el conejo, o anticuerpos monoclonales.

Preferiblemente, la invención se refiere a la utilización de una preparación de anticuerpo seleccionada entre el grupo consistente por anticuerpos policlonales o monoclonales, o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son de origen múrido.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (AcMo) incluye anticuerpos monoclonales, quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos para anticuerpos anti-idiotípicos (anticuerpo anti-anti-Id) que se pueden marcar en forma soluble o unida, así como fragmentos de los mismos proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero no limitada a la misma, escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes.

Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, cuya población contiene sitios de unión al epítipo sustancialmente similares. Los AcMos pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); documento de Patente de EE.UU. n° 4.376, 110; Ausubel y col., compiladores, Harlow y Lane: *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan y col., compiladores, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience N.Y., (1992-1996). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM.

Se dice que un anticuerpo monoclonal es "capaz de unirse" a una molécula, si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula, uniendo de este modo la molécula con el anticuerpo. El término "epítipo" se refiere a aquella porción de cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo, que también puede ser reconocida por ese anticuerpo. Epítopos o "determinantes antigénicos" consisten generalmente en agrupaciones químicamente activas en la superficie, de moléculas 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 capaz de unirse a un anticuerpo, cuyo antígeno es adicionalmente capaz de inducir a un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica mencionada anteriormente indica que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con un epítipo en su anticuerpo correspondiente y no con una multitud de otros anticuerpos que se pueden obtener por otros antígenos.

Un anticuerpo anti-idiotipo (anti-id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se pueden preparar mediante la inmunización de un animal de la misma especie y tipo genético (una cepa de ratón, por ejemplo) como fuente del AcMo contra el que se está preparando un 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, el documento de Patente de EE.UU. n° 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id también puede ser utilizado como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al AcMo original, que inducía el anti-Id. Así, mediante el uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un AcMo, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

En consecuencia, los AcMos generados contra fragmentos de NIK se pueden utilizar para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Las células del bazo de dichos ratones inmunizados se utilizan para producir hibridomas anti-Id que secretan AcMos anti-Id. Además, los AcMos anti-Id se pueden acoplar a un vehículo, tal como hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) y utilizar para inmunizar ratones BALB/c adicionales. Los sueros de estos ratones contendrán anticuerpos anti-Id que tienen las propiedades de unión del AcMo original, específico para un epítipo o un fragmento de NIK.

Los AcMos anti-Id tienen por tanto sus propios epítopos idiotípicos o "idiotopos", estructuralmente similares al epítopo que está siendo evaluado.

5 Una preparación tal y como se describe en esta memoria, de un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento de anticuerpo, también se puede utilizar para aplicaciones que implican la administración de la preparación a un individuo. Por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento de anticuerpo generalmente tenderán a ser tolerados inmunológicamente de forma óptima, y por lo tanto, mostrarán una semivida óptima *in vivo* en un ser humano, y por lo tanto mostrarán una eficacia óptima. Una explicación adicional sobre la producción y la explotación de anticuerpos humanos o humanizados se proporciona más adelante.

10 Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención se pueden utilizar para detectar cuantitativa o cualitativamente la NIK o una muteína, un derivado funcional, una fracción activa, un derivado permutado circularmente, una sal o una porción de la misma en una muestra, o para detectar la presencia de células que expresan NIK o una muteína, un derivado funcional, una fracción activa, un derivado permutado circularmente, una sal o porciones de las mismas. Esto se puede realizar mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado con fluorescencia acoplado, con microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o detección fluorométrica.

15 Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención se pueden emplear histológicamente, en inmunofluorescencia o en microscopía inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de NIK o de porciones de la misma de la presente invención. La detección *in situ* puede efectuarse extrayendo de un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando el anticuerpo marcado de la presente invención a tal espécimen. El anticuerpo (o el fragmento) se proporciona preferiblemente mediante la aplicación o la superposición del anticuerpo marcado (o del fragmento) a una muestra biológica. Mediante el uso de tal procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de NIK o de porciones de la misma, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, los expertos percibirán fácilmente que cualquiera entre una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) se puede modificar con el fin de lograr tal detección *in situ*.

20 La muestra biológica puede estar acoplada a un soporte o a un vehículo sólido tal como nitrocelulosa, u otro soporte o vehículo sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas de células o proteínas solubles. El soporte o el vehículo se pueden lavar a continuación con tampones adecuados, seguido de tratamiento con un anticuerpo marcado, de acuerdo con la presente invención, tal y como se ha señalado anteriormente. El soporte o vehículo sólido se puede lavar después con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido a dicho soporte o vehículo sólido se puede detectar entonces por medios convencionales.

25 Por "soporte en fase sólida", "vehículo en fase sólida", "soporte sólido", "vehículo sólido", "soporte" o "vehículo" se entiende cualquier soporte o vehículo capaz de unirse al antígeno o a los anticuerpos. Soportes o vehículos bien conocidos, incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas de nailon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierto grado o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible, siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte o del vehículo puede ser esférica, como en una perla, cilíndrica como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, tal como una hoja, tira de ensayo, etc. Los soportes o vehículos preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir un anticuerpo o un antígeno, o serán capaces de determinar el mismo mediante el uso de experimentación de rutina.

30 La actividad de unión de un lote dado de anticuerpos, de la invención tal y como se ha indicado anteriormente, se puede determinar de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación, empleando una experimentación rutinaria.

35 Otras etapas tales como el lavado, agitación, sacudida, filtración y similares se pueden añadir a los ensayos como es habitual o necesario según la situación particular.

40 Una de las formas de acuerdo con la presente invención, en que se puede marcar un anticuerpo es ligando el mismo a una enzima y utilizándolo en un inmunoensayo enzimático (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando se expone después a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal manera que producirá un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por espectrofotometría, fluorometría o por medios visuales. Las enzimas que se pueden utilizar para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a las mismas, deshidrogenasa de malato, nucleasa estafilocócica, isomerasa de delta-5-esteroide, deshidrogenasa de levadura alcohol, deshidrogenasa de alfa-glicerofosfato, isomerasa de triosa fosfato, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, oxidasa de glucosa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, glucoamilasa y esterasa de acetilcolina. La detección puede llevarse a cabo mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede realizarse por comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato, en comparación con patrones preparados de manera similar.

45 La detección puede llevarse a cabo utilizando cualquiera entre una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo,

mediante marcación radiactiva de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, es posible detectar la R-PTPasa mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA). Una buena descripción de RIA se puede encontrar en "Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology", de Work, T.S. y col., North Holland Publishing Company, NY (1978) con particular referencia al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" de Chard, T. El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador g o un contador de centelleo o por autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a la luz de una longitud de onda apropiada, su presencia puede ser detectada a continuación, debido a la fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes utilizados más comúnmente están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, picocianina, aloficocianina, oftalaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también se puede marcar de forma detectable utilizando metales que emiten fluorescencia, tales como ¹⁵²E, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden fijar al anticuerpo utilizando grupos quelantes metálicos, tales como ácido dietilentriamina pentaacético (ETPA).

El anticuerpo también se puede marcar para su detección mediante un acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado de forma quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles, son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Asimismo, se puede utilizar 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 los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para los fines marcadores son luciferina, luciferasa y aecurina.

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

Los ensayos inmunométricos típicos y preferidos incluyen ensayos "directos" en los que el anticuerpo unido a la fase sólida se pone en contacto primero con la muestra que se va a someter a ensayo, para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo binario en fase sólida de anticuerpo-antígeno. Después de un período de incubación adecuado, el soporte o el vehículo sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra líquida, incluyendo el antígeno que no ha reaccionado, si lo hay, y después se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como "molécula informadora"). Después de un segundo período de incubación para permitir que el anticuerpo marcado forme un complejo con el antígeno unido al soporte o vehículo sólido a través del anticuerpo no marcado, el soporte o vehículo sólido se lava una segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado que no ha reaccionado.

En otro tipo de ensayo "sándwich", que también puede ser útil con los antígenos descritos en esta memoria, se emplean los ensayos denominados "simultáneo" e "inverso". Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación cuando el anticuerpo unido al soporte o al vehículo sólido y el anticuerpo marcado se añaden ambos a la muestra que se va a someter a ensayo, al mismo tiempo. Una vez completada la incubación, el soporte o el vehículo sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra líquida y el anticuerpo marcado que no ha formado complejo. La presencia de anticuerpo marcado asociado con el soporte o el vehículo sólido se determina entonces, como si fuera un ensayo convencional "directo" convencional de tipo sándwich.

En el ensayo "inverso", se emplea la adición por etapas, primero de una solución de anticuerpo marcado a la muestra líquida, seguida de la adición de anticuerpo sin marcar unido a un soporte o un vehículo sólido, después de un período de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, la fase sólida se lava de manera convencional para liberarla del residuo de la muestra que se va a someter a ensayo y la solución de anticuerpo marcado que no ha reaccionado. La determinación de anticuerpo marcado asociado con un soporte o un vehículo sólido se determina entonces como en los ensayos "simultáneo" y "directo".

La preparación se puede utilizar per se o se puede formular como un ingrediente activo en una composición farmacéutica.

Por tanto, tal y como se describe en esta memoria, 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.

Los métodos para formular el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención como ingrediente ac-

tivo en una composición farmacéutica, y los métodos para hacer uso de dicha composición farmacéutica, se describen más adelante.

5 Tal y como se ha descrito anteriormente, como resultado de su capacidad para unirse específicamente a una región, tal como una región funcional, de NIK, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar para regular una actividad bioquímica de una molécula NIK asociada con tal región funcional.

Así, de acuerdo con aún otro aspecto de esta memoria descriptiva, se proporciona un método para regular una actividad bioquímica de una molécula NIK. El método se efectúa poniendo en contacto la molécula NIK con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo tal y como se describe en esta memoria.

En particular, el método se puede utilizar para regular la actividad bioquímica en una molécula NIK humana.

10 Además, en esta memoria se describe el uso de una preparación de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una secuencia de aminoácidos, o a una porción de dicha secuencia de aminoácidos, describiéndose dicha secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 18, 19, 20 y/o 22, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada o agravada por la actividad de NIK.

15 Otro aspecto de esta memoria descriptiva se refiere a un método para tratar una enfermedad causada o agravada por la actividad de NIK que comprende administrar a un individuo que lo requiera una preparación de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una secuencia de aminoácidos, o a una porción de dicha secuencia de aminoácidos, describiéndose dicha secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 18, 19, 20 y/o 22.

20 Tal y como se ha descrito anteriormente, puesto que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse específicamente a la región cinasa de NIK de manera que se regula a la baja la actividad cinasa de NIK, y puesto que tal actividad es necesaria para la activación de NF-κB, tal y como se detalla extensamente en la sección anterior de "Campo y Antecedentes de la Invención", el método puede ser utilizado para regular a la baja de forma óptima la actividad de NF-κB.

25 Por lo tanto, como resultado de poder permitir una regulación a la baja óptima de la actividad de NF-κB, el método se puede utilizar para tratar de forma óptima en un individuo, una enfermedad asociada con una regulación alterada de la actividad de NF-κB, en particular una actividad excesiva o constitutiva de NF-κB.

30 Cuando se utiliza el método de acuerdo con este aspecto descrito en esta memoria para tratar la enfermedad en el individuo, la puesta en contacto de la molécula NIK con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se puede efectuar de manera ventajosa administrando el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a un individuo.

En particular, la administración del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo se puede efectuar mediante la administración de la composición farmacéutica descrita en esta memoria, que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo descrito en esta memoria como un ingrediente activo.

35 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se pueden administrar a fin de lograr un nivel suficiente de fragmento de anticuerpo unido al antígeno diana, de modo que se logre una regulación deseada de la actividad bioquímica.

También, se proporciona un método para preparar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención. El método comprende hacer crecer el clon del hibridoma Pep 7-81.1 en un medio líquido o en el abdomen de un mamífero para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.

40 Ejemplos de hibridomas para ser utilizados en la preparación de los anticuerpos monoclonales, es el clon del hibridoma Pep 7-81.1, depositado en la CNCM con el n° I-3092.

Un experto ordinario en la técnica, tal como un médico, en particular un médico especializado en la enfermedad, poseerá los conocimientos técnicos necesarios para determinar un protocolo terapéutico adecuado, incluyendo una ruta de administración adecuada, y una dosificación adecuada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo para tratar con eficacia la enfermedad de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

45 NIK es normalmente una molécula intracelular y, como tal, con el fin de poner en contacto de forma óptima el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con la molécula NIK en una célula, tal como una célula caracteriza por una regulación alterada de la actividad de NF-κB, el método se debe poner en práctica de modo que facilite el contacto del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo con la molécula NIK dentro de la célula.

50 Dicha puesta en contacto intracelular puede facilitarse de varias maneras, dependiendo de la aplicación y de los fines.

Por ejemplo, dicha puesta en contacto intracelular se puede efectuar poniendo en contacto la célula con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo junto con un vehículo de base lipídica capaz de facilitar la penetración del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo dentro de la célula.

Alternativamente, dicha puesta en contacto intracelular se puede efectuar transformando genéticamente la célula con un vector de expresión capaz de expresar intracelularmente el fragmento de anticuerpo de la presente invención.

Los tipos adecuados de vehículos lipídicos para facilitar la entrada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo en la célula, incluyen liposomas e inmunoliposomas. Los inmunoliposomas, por permitir la entrega de moléculas de forma específica del tipo celular, se pueden emplear ventajosamente para entregar selectivamente el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en células afectadas por enfermedad, en donde dichas células expresan antígenos de superficie distintivos, tales como marcadores de la inflamación en células que muestran una respuesta inmune patológica (por ejemplo, CD25 o CD69 en los linfocitos T activados), o antígenos asociados a tumores en células cancerígenas (por ejemplo, HER-2 en células de adenocarcinoma, MAGE-1 en células de melanoma y similares).

Una amplia guía para el uso de tales vehículos basados en lípidos para la entrega intracelular de moléculas terapéuticas, tales como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención, a células enfermas se proporciona en la bibliografía técnica (por ejemplo, véase: Abra RM. y col., 2002. *J Liposome Res.* 12:1-3; Park JW., 2002. *Breast Cancer Res.*; 4(3):95-9; Bendas G., 2001. *BioDrugs* 15:215-24; Maruyama K., 2000. *Biol. Pharm Bull.* 23:791-9; Hong K. y col., 1999. *Ann NY Acad Sci.* 886:293-6; Margalit R., 1995. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 12:233-61; Storm G. y Crommelin DJ., 1997. *Hibridoma* 16:119-25; ParK JW. y col., 1997. *Adv Pharmacol.* 40:399-435).

La producción de un fragmento de anticuerpo recombinante, tal como el fragmento de anticuerpo recombinante descrito en esta memoria, de forma intracelular es una práctica habitual en la técnica. Un fragmento de anticuerpo recombinante expresado intracelularmente puede ser denominado un "intracuerpo" en la técnica. Una amplia guía para el uso de la expresión intracelular de un fragmento de anticuerpo recombinante capaz de unirse específicamente a una biomolécula, para regular una actividad bioquímica, tal como una actividad enzimática, de la biomolécula en una celda, se proporciona en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, véase: Mhashilkar AM. y col., 2002. *Gene Ther.* 9:307-19; Arafat W. y col., 2000. *Cancer Gene Ther.* 7:1250-6; Cohen PA. y col., 1998. *Oncogene* 17:2445-56; Hasanzadeh Gh G. y col., 1998. *FEBS Lett.* 437:81-6; Richardson JH. y col., 1998. *Gene Ther.* 5:635-44; para una orientación general de la expresión de un fragmento de anticuerpo recombinante en una célula, véase, por ejemplo: der Maur AA. y col., 2002. *J Biol Chem.* 277:45075-85; Zhu Q. y col., 1999. *J Immunol Methods.* 231:207-22; Wirtz P. y Steipe B., 1999. *Protein Sci.* 8:2245-50; Ohage E. y Steipe B., 1999. *J Mol Biol.* 291:1119-28).

Transformar genéticamente una célula de mamífero con un vector de expresión se puede efectuar empleando cualquiera entre diversos métodos de la técnica puestos en práctica comúnmente, tales como la transfección estable o transitoria, la lipofección, la electroporación y la infección con vectores víricos recombinantes. Una amplia guía para la puesta en práctica de tales métodos se recoge en la bibliografía técnica [por ejemplo, véase: Sambrook y col., más arriba y las referencias asociadas; Chang y col. en: "Somatic Gene Therapy", CRC Press, Ann Arbor, MI (1995); Vega y col. en: "Gene Targeting", CRC Press, Ann Arbor, MI. (1995); "Vectors, A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses", Butterworths, Boston, MA (1988); Gilboa y col., 1986. *Biotechniques* 4:504-512; para vectores que afectan el sistema nervioso central, véase, por ejemplo, el documento de patente de los Estados Unidos 4.866.042; para métodos de selección positiva-negativa para inducir la recombinación homóloga, véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de los Estados Unidos 5.464.764 y 5.487.992].

Más adelante se proporciona una orientación adicional en relación con la producción y explotación de vectores de expresión para expresar un fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el método de acuerdo con este aspecto descrito en esta memoria se puede utilizar para tratar de forma óptima una enfermedad asociada con una regulación alterada de la actividad de NF- κ B. La actividad de NF- κ B está implicada generalmente en la activación de una gama muy amplia de respuestas inmunes, incluyendo las provocadas por: receptores de antígenos de linfocitos, receptores coestimuladores de linfocitos, receptores de TNF, receptores de interleucina, LMP1, RANK, receptor de Toll humano y lipopolisacárido (LPS). Puesto que tales receptores están implicados en la mediación de una gama muy amplia de tipos de respuestas inmunitarias, el método de acuerdo con este aspecto de esta memoria descriptiva se puede utilizar para el tratamiento de numerosas enfermedades cuya patogénesis está asociada con tales respuestas inmunes. Dichas enfermedades incluyen enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades relacionadas con el trasplante y enfermedades alérgicas. Por ejemplo, se ha mostrado que NF- κ B está involucrado en la patogénesis de diversos ejemplos de tales enfermedades, que incluyen enfermedades alérgicas tales como el asma, enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria tal como la enfermedad inflamatoria del intestino, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer, y enfermedades relacionadas con el trasplante tales como el rechazo del trasplante. Además, una señalización mal regulada de NF- κ B se ha observado que está asociada con varias enfermedades cancerígenas.

Como tal, el método de acuerdo con este aspecto descrito en esta memoria, se puede utilizar para tratar eficazmente enfermedades tales como enfermedades autoinmunes, inflamatorias, relacionadas con trasplantes, alérgicas y cancerígenas.

Ejemplos específicos de enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con este aspecto de esta memoria descrip-

tiva, se enumeran a continuación.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el antígeno diana, que es un polipéptido, puede obtenerse de varias maneras.

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

- 5 Alternativamente, el antígeno diana se puede obtener mediante la escisión proteolítica de NIK expresada de forma natural, o se puede obtener a través de técnicas recombinantes convencionales *in vitro*, utilizando sistemas de expresión *in vitro* (por ejemplo, véase más abajo Sambrook y col., y las referencias asociadas).

10 El antígeno diana se puede sintetizar químicamente utilizando, por ejemplo, técnicas convencionales en fase sólida. Tales técnicas incluyen la síntesis exclusiva en fase sólida, métodos de síntesis parciales en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución. Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica [por ejemplo, véase Stewart y col., en "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed., Pierce Chemical Company, (1984)].

15 Un polipéptido sintético se puede purificar mediante un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución, tal como se describe por Creighton T. ["Proteins, structures and molecular principles", W.H. Freeman y Co. N.Y. (1983)] y su secuencia de aminoácidos se puede confirmar mediante procedimientos convencionales de secuenciación de aminoácidos.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la preparación se obtiene preferiblemente mediante la inmunización de un mamífero con el antígeno diana.

20 La generación de la preparación *in vivo* se puede efectuar ventajosamente por inyección repetida del antígeno diana en un mamífero en presencia de adyuvantes de acuerdo con un programa que estimula la producción de anticuerpos en el suero. En los casos en los que el antígeno diana es demasiado pequeño para provocar una respuesta inmuno-génica adecuada (denominado "hapteno" en la técnica), el hapteno se puede acoplar a un vehículo antigénicamente neutro, tal como vehículos de hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o seroalbúmina [por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA)] (por ejemplo, véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 5.189.178 y 5.239.078). El acoplamiento de un hapteno a un vehículo se puede efectuar utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el acoplamiento directo a grupos amino se puede efectuar y seguir opcionalmente por reducción del enlace imino formado. Alternativamente, el vehículo se puede acoplar utilizando agentes de condensación, tales como diclorhexil carbodiimida u otros agentes deshidratantes de carbodiimida. Los compuestos enlazantes también se pueden utilizar para efectuar el acoplamiento; los enlazadores heterobifuncionales y homobifuncionales están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El complejo inmunógeno resultante se puede inyectar a continuación en mamíferos adecuados, tales como ratones, conejos y similares. Después de la generación *in vivo* de un anticuerpo, su título sérico en el mamífero hospedador se puede medir fácilmente utilizando procedimientos de inmunoensayo que son bien conocidos en la técnica.

35 Tal y como se ha descrito anteriormente, la preparación puede comprender ventajosamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humanizado.

40 Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly y col., documento de solicitud de patente europea 125.023 (publicada el 14 de noviembre, 1984); Taniguchi y col., documento de solicitud de patente europea 171.496 (publicada el 19 de febrero, 1985); Morrison y col., documento de solicitud de patente europea 173.494 (publicada el 5 de marzo, 1986); Neuberger y col., documento de solicitud PCT WO 8601533, (publicada el 13 de marzo, 1986); Kudo y col., documento de solicitud de patente europea 184.187 (publicada el 11 de junio, 1986); Robinson y col., documento de solicitud de patente internacional nº WO8702671 (publicado el 7 de mayo, 1987); Riechmann y col. y Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", véase más arriba.

45 Los "anticuerpos humanos" son moléculas que contienen tanto la región variable como la constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos completos son particularmente adecuados para uso terapéutico, ya que la inmunogenicidad anti-idiotípica tiene que reducirse significativamente o mejor estar ausente. Un método para la preparación de anticuerpos humanos completos consiste en la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón, es decir, la producción de cepas de ratón capaces de producir Ig humana (Xenorratones), mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que los genes endógenos de Ig han sido inactivados. Los loci de Ig son excesivamente complejos en términos de su estructura física y los procesos de reordenamiento genético y de expresión, requeridos para producir finalmente una respuesta inmune amplia. La diversidad de los anticuerpos se genera principalmente mediante la reorganización combinatoria entre diferentes genes de 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, el cambio de clase y la maduración de la afinidad. La introducción de transgenes no reordenados de Ig humana en ratones ha mostrado que la maquinaria recombinatoria del ratón es compatible con genes humanos. Además, se pueden obtener hibridomas secretores de hu-AcMos específicos de antígenos, con varios isotipos, mediante la inmunización de Xenorratones con antígeno.

Los anticuerpos humanos completos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Méndez y col.

(1997); Buggemann y col. (1991); Tomizuka y col., (2000) documento de Patente WO98/24893).

5 Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "muteínas" se refiere a análogos de NIK, en los que uno o varios de los residuos de aminoácidos de los componentes naturales de NIK se sustituyen por diferentes residuos de aminoácidos, o se eliminan, o uno o varios residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia original de NIK, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes, en comparación con la NIK original. Estas muteínas se preparan por técnicas de síntesis conocidas y/o por mutagénesis dirigida el sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

10 Las muteínas de acuerdo con la presente memoria descriptiva incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una NIK, de conformidad con la presente memoria descriptiva, bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de la hibridación y a las posteriores condiciones de lavado, a las que los expertos en la técnica convencionalmente se refieren como "rigurosas". Véase, Ausubel. y col., Current Protocols in Molecular Biology, más abajo, Interscience, Nueva York, cap. 6.3 y 6.4 (1987,1992), y Sambrook y col. (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

15 Sin estar limitados, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen unas condiciones de lavado de 12°-20°C por debajo de la Tm calculada del híbrido en estudio, por ejemplo, en 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y luego, 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica entienden que las condiciones rigurosas también dependerán de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas de oligonucleótidos (tal como 10-40 bases) o las sondas mixtas de oligonucleótidos. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase más arriba, Ausubel.

20 Cualquier muteína tal tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de NIK, de modo que tenga una actividad sustancialmente similar o aún mejor que la de NIK.

25 En una realización preferida, cualquier muteína tal tiene al menos 40% de identidad o de homología con la secuencia de aminoácidos de NIK. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o, más preferiblemente, al menos el 90% de identidad o de homología con la misma.

30 La identidad refleja una relación entre dos o varias secuencias de polipéptidos o dos o varias secuencias de polinucleótidos, determinada por comparación de las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido, o de aminoácido a aminoácido, de los dos polinucleótidos o las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando.

35 Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "porcentaje de identidad". En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para proporcionar una máxima correlación entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "huecos" en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Un porcentaje de identidad se puede determinar sobre la longitud completa de cada una de las secuencias que se comparan (denominada, alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias con la misma longitud o muy similares, o sobre longitudes más cortas, definidas (denominada, alineación local), que es más adecuada para secuencias de longitud desigual.

40 Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias, son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el "Wisconsin Sequence Analysis Package", versión 9.1 (Devereux, J. y col. 1984, Nucleic Acids Res. 11 de Ene 1984; 12 (1 Pt 1):387-95), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, se pueden utilizar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y la identidad% y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de la "homología local" de Smith y Waterman (J Theor Biol. 21 de julio 1981; 91(2):379-80 y J Mol Biol. 25 de marzo 1981, 147(1):195-7) y encuentra la región aislada con mejor similitud entre dos secuencias. Otros programas para la determinación de la identidad y/o similitud entre secuencias son también conocidos en la técnica, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul SF y col., 1990 J Mol Biol. 5 de octubre 1990, 215(3):403-10, Proc Natl Acad Sci USA. Jul 1990, 87(14):5509-13, Altschul SF y col., Nucleic Acids Res. 1 de septiembre 1997, 25(17):3389-402, accesible a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson WR, Methods Enzymol. 1990, 183:63-98. Pearson J Mol Biol. 13 de febrero 1998, 276(1):71-84).

50 Las muteínas de NIK, que se pueden utilizar tal y como se describe en esta memoria, o los ácidos nucleicos que las codifican, incluyen un conjunto limitado de secuencias que se corresponden sustancialmente como péptidos o polinucleótidos de sustitución, que pueden ser obtenidos habitualmente por un experto ordinario en la técnica, sin una experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y la orientación presentadas en esta memoria.

55 Los cambios preferidos para muteínas de acuerdo con la presente memoria descriptiva son lo que se conoce como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de NIK pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades físicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula. Es evidente que las inserciones y deleciones de aminoácidos también se pueden hacer en las secuencias definidas anteriormente, sin alterar su función, particu-

larmente si las inserciones o deleciones implican sólo unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son esenciales para una conformación funcional, por ejemplo, los residuos de cisteína.

- 5 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y los grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos son los definidos en la Tabla C.

TABLA A

Grupos de Aminoácidos Sinónimos Preferidos

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

10 TABLA B

Grupos de Aminoácidos Sinónimos Más Preferidos

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

TABLA C

Grupos de Aminoácidos Sinónimos Lo Más Preferidos

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

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para la obtención de muteínas de NIK, para el uso tal y como se describe en esta memoria, incluyen cualquier etapa de métodos conocidos, tal como se presentan en los documentos de patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark y col.; 5.116.943 de Koths y col.; 4.965.195 de Namen y col.; 4.879.111 de Chong y col.; y 5.017.691 de Lee y col.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en el documento de patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Shaw y col.).

"Derivados funcionales" tal y como se usa en esta memoria, incluye los derivados de NIK, y sus muteínas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales sobre los restos o son añadidos a los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica.

10 Una "fracción activa" de acuerdo con la presente memoria descriptiva, puede ser, por ejemplo, un fragmento de NIK. El término fragmento se refiere a cualquier subgrupo de la molécula, es decir, un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante la eliminación de aminoácidos desde cualquier extremo de la molécula de NIK y sometiendo a ensayo el fragmento resultante para estudiar su actividad. Las proteasas para eliminar un aminoácido a la vez, ya sea del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido, se conocen y determinar los fragmentos que conservan la actividad biológica deseada, implica sólo una
15 experimentación de rutina.

Como fracciones activas de NIK, muteínas y proteínas fusionadas de las mismas, la presente memoria descriptiva abarca cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína aislada o junto con moléculas asociadas o restos ligados a la misma, por ejemplo, restos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a NIK.
20

El término "sales" se refiere en esta memoria a sales de grupos carboxilo y a sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula NIK o de sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y las sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido 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 conservar la actividad biológica de NIK.
25

30 La expresión "permutada circularmente" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a una molécula lineal en la que se han unido los extremos, ya sea directamente o a través de un enlazador, para producir una molécula circular, y luego la molécula circular se abre en otro lugar para producir una nueva molécula lineal con extremos diferentes de los extremos de la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha circularizado y después abierto. Así, una molécula permutada circularmente se puede sintetizar de nuevo como una molécula lineal y no tener nunca que pasar por una etapa de circularización y de apertura. La permutación circular particular de una molécula se designa con paréntesis que contienen los restos de aminoácidos entre los cuales se elimina el enlace peptídico. Las moléculas permutadas circularmente, que pueden incluir ADN, ARN y proteínas, son moléculas monocatenarias, que tienen sus extremos terminales normales fusionados, a menudo con un enlazador, y contienen nuevos extremos terminales en otra posición. Véase, Golden-
35

berg, y col. *J. Mol. Biol.*, 165:407-413 (1983) y Pan y col. *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 luego cortar la molécula circular en una posición diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con extremos terminales diferentes. Una permutación circular tiene, por tanto, el efecto de conservar esencialmente la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína, a la vez que se generan nuevos extremos terminales en lugares distintos.

Los anticuerpos humanizados o los fragmentos de anticuerpo son anticuerpos quiméricos o fragmentos de anticuerpos modificados genéticamente que tienen preferiblemente porciones mínimas obtenidas a partir de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) se sustituyen por residuos de una región determinante de complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, los residuos estructurales de Fv del anticuerpo humano son sustituidos por residuos correspondientes no humanos. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la región determinante de complementariedad importada o secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable y típicamente dos, en donde todas o sustancialmente la totalidad de la regiones determinantes de complementariedad se corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones estructurales se corresponden a las de una secuencia de consenso humana correspondiente. Los anticuerpos humanizados de forma óptima también incluyen por lo menos una porción de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, obtenida típicamente a partir de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones y col., 1986. *Nature* 321:522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332:323-329; y Presta, 1992. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596). Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos o fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. A estos residuos de aminoácidos no humanos se hace referencia a menudo como residuos importados que se toman típicamente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente tal y como se describe (véase, por ejemplo: Jones y col., 1986. *Nature* 321:522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col., 1988. *Science* 239:1534-1536; el documento de Patente de EE.UU. n° 4.816.567) sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad humanas por regiones determinantes de complementariedad correspondientes 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 secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser típicamente anticuerpos humanos, en los que algunos residuos de la región determinante de complementariedad y, posiblemente, algunos residuos estructurales están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Los anticuerpos humanos o los fragmentos de anticuerpos también se pueden producir mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen las genotecas de presentación de fagos [véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991. *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks y col., 1991. *J. Mol. Biol.* 222:581; Cole y col., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., 1991. *J. Immunol.* 147:86-95). Los anticuerpos humanizados también se pueden preparar mediante la introducción de secuencias que codifican loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, en ratones en los que los genes endógenos de la inmunoglobulina han sido inactivados parcial o totalmente. Después de la exposición antigénica, la producción de anticuerpos humanos que se observa en estos animales se asemeja mucho a la que se observa en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el montaje de la cadena y el repertorio de anticuerpos. Se proporciona una amplia guía para la puesta en práctica de este enfoque en la bibliografía técnica (por ejemplo, véanse: los documentos de patente de EE.UU. n° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., 1992. *Bio/Technology* 10:779-783; Lonberg y col., 1994. *Nature* 368:856-859; Morrison, 1994. *Nature* 368:812-13; Fishwild y col., 1996. *Nature Biotechnology* 14:845-51; Neuberger, 1996. *Nature Biotechnology* 14:826; Lonberg y Huszar, 1995. *Intern. Rev Immunol.* 13:65-93).

Tal y como se ha descrito anteriormente, un fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede expresar ventajosamente de forma intracelular, por ejemplo, utilizando un vector de expresión.

Un método preferido para modificar genéticamente una célula de un individuo con un vector de expresión, es emplear un vector vírico. Los vectores víricos ofrecen diversas ventajas, que incluyen una mayor eficacia de la transformación, y la orientación hacia la diana, y la propagación en tipos específicos de células. Los vectores víricos también pueden ser modificados con receptores o ligandos específicos para alterar la especificidad de la diana a través de receptores celulares específicos, tales como receptores de células cancerosas. Tal capacidad de orientación hacia la diana se puede utilizar para dirigir la expresión de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula caracterizada por una regulación alterada de la actividad de NF- κ B.

Los vectores retrovíricos representan una clase de vectores adecuados para el uso descrito en esta memoria más arriba. Los retrovirus defectuosos se utilizan 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 expresar proteínas recombinantes. Se pueden retirar porciones del genoma retrovírico para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa y el retrovirus con la replicación defectuosa se puede empaquetar después dentro de viriones, que se pueden utilizar para infectar las células diana mediante el uso de un virus auxiliar y al mismo tiempo empleando técnicas convencionales. En la bibliografía técnica se proporciona una amplia guía para

la generación de un vector retroviral capaz de expresar una proteína recombinante en una célula de mamífero (por ejemplo, véase, Miller, A.D., 1990. Blood 76:271; Sambrook y col., véase más arriba y las referencias asociadas).

Otro vector de expresión adecuado puede ser un vector adenoviral. Los vectores adenovirales se han estudiado a fondo y utilizado rutinariamente como vectores para la transferencia génica. Las principales ventajas de los vectores adenovirales incluyen una eficacia relativamente alta de la transducción de las células en división y quiescentes, el tropismo natural hacia una amplia gama de tejidos epiteliales y la producción sencilla de títulos elevados. El ADN de adenovirus es transportado hasta el núcleo, pero no se integra en su interior. De este modo, se minimiza el riesgo de mutagénesis con vectores adenovirales. Se proporciona una amplia guía para la producción y la explotación de vectores adenovirales para el tratamiento de enfermedades en la bibliografía técnica [por ejemplo, véase: Russel, W.C., 2000. J. Gen. Virol. 81:57-63; para una orientación con respecto al uso de vectores adenovirales para el tratamiento del cáncer, véase, por ejemplo, Seth y col., "Adenoviral vectors for cancer gene therapy". En: P. Seth (compilador) Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, Landes, Austin, TX, p.103-120 (1999)].

Un ejemplo específico de un vector adenoviral adecuado es el vector obtenido a partir de adenovirus Ad-TK. Este vector expresa un gen cinasa de timidina (TK) de herpes virus, para una selección positiva o negativa, e incluye una casete de expresión para las secuencias recombinantes deseadas. Este vector se puede utilizar para infectar células que tienen un receptor de adenovirus que incluye la mayoría de los cánceres de origen epitelial (Sandmair y col., 2000. Hum. Gene. Ther. 11:2197-2205).

Un vector de expresión vírica adecuado también puede ser un vector quimérico de adenovirus/retrovirus que combina componentes retrovirales y adenovirales, y que ha demostrado ser más eficaz que los vectores de expresión tradicionales. Se proporciona una amplia guía para la producción y la explotación de dichos vectores en la bibliografía técnica (por ejemplo, véase Pan y col., 2002. Cancer Letters 184:179-188).

El vector de expresión se puede administrar de varias maneras. Si se utilizan vectores víricos, el procedimiento puede tener ventaja por su especificidad hacia la diana y, en consecuencia, dichos vectores pueden no tener que ser administrados 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 se puede realizar mediante, por ejemplo, por inyección intravenosa o subcutánea en el individuo. Después de la inyección, los vectores víricos circularán hasta que reconozcan las células hospedadoras con una especificidad diana apropiada para la infección.

También se ha descrito anteriormente una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención como ingrediente activo.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o varios de los ingredientes activos descritos en este documento, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El objetivo de una composición farmacéutica es facilitar la administración de los ingredientes activos a un organismo.

En esta memoria, la expresión "ingredientes activos" se refiere al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo de la presente invención, responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad biológica y las propiedades de los ingredientes activos administrados. Un adyuvante se incluye en estas expresiones.

En esta memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

Las rutas de administración adecuadas de la composición farmacéutica pueden incluir, por ejemplo, el suministro por vía oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluye la inyección intramuscular, subcutánea e intramedular así como intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Alternativamente, la composición farmacéutica se puede administrar de forma local en lugar de forma sistémica, por ejemplo, mediante una inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular del individuo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, captura o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente memoria descriptiva se pueden formular de manera convencional usando uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Una formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida.

5 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosa, se utilizan en la formulación agentes de penetración apropiados para que la barrera pueda ser permeada. Tales agentes de penetración son conocidos generalmente en la técnica.

10 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los ingredientes activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para la ingestión oral en un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar utilizando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluye 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, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carboxipol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de lacas y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Colorantes o pigmentos se pueden añadir a los recubrimientos de las tabletas o grageas para identificar o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral, incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados por adición con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir agentes estabilizantes.

Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

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

Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente memoria descriptiva, se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador, con el uso 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 suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos, por ejemplo, de gelatina para su uso en un dispensador, se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo de los ingredientes activos y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en esta memoria se puede formular para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un agente conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones adecuadas, inyectables oleosas o a base de agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también agentes estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Alternativamente, los ingredientes activos pueden estar en forma de polvo para su reconstitución antes del uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución estéril a base de agua, exenta de pirógenos.

5 La composición farmacéutica descrita en esta memoria también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente memoria descriptiva, incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención) capaz de evitar, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad, o prolongar la supervivencia del individuo que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente teniendo en cuenta la descripción detallada proporcionada en esa memoria.

15 Para cualquier preparación utilizada en los métodos descritos en esta memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para lograr una concentración o título deseados. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

20 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en este documento se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo *in vitro* y celulares, y de estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosis pueden ser elegidas por el médico según el estado paciente (por ejemplo, véase Fingl, y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 p. 1).

25 La cantidad de la dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma o en el cerebro de los ingredientes activos que sean suficientes para ejercer un efecto terapéutico deseado (concentración mínima eficaz, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de los datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden emplear ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

30 Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta del estado a tratar, la dosificación puede ser una sola administración o una pluralidad de administraciones, durante el tratamiento con una duración desde varios días hasta varias semanas o hasta que se produce la curación o se logra una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá por supuesto, de la persona que se va a tratar, de la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que receta, etc.

35 Las composiciones descritas en esta memoria se pueden presentar, si se desea, en un envase o en un dispositivo dispensador, tal como un kit de aprobado por la FDA, que puede contener una o varias formas de dosificación unitaria que contienen los ingredientes activos. El envase, por ejemplo, puede comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase de burbujas. El envase o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados de las instrucciones para su administración. El envase o el dispositivo dispensador también pueden estar acompañado por un aviso relacionado con el recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, siendo la notificación un reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o de la administración a humanos o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la "Food and Drug Administration" de EE.UU. para medicamentos con receta, o un prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible, también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una enfermedad indicada, tal y como se ha detallado más arriba.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la composición descrita en esta memoria se puede utilizar para tratar una enfermedad asociada con una respuesta inmune patológica.

50 Ejemplos de tales 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 una hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), enfermedades autoinmunes y enfermedades asociadas con el trasplante de un injerto.

55 Otros ejemplos de enfermedades asociadas con la hipersensibilidad incluyen, por ejemplo, las enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo III (mediadas por el complejo inmune), enfermedades asociadas con la inflamación, enfermedades asociadas con la infección y enfermedades asociadas con hipersensibilidad idiopática.

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo I incluyen, pero no se limitan a las mismas, las enfermedades alérgicas tales como el asma, sarpullido, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros, alergia al veneno, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a medicamentos, alergia a picaduras de insectos, alergia a la caspa de animales, alergia a las ortigas, alergia a la hiedra venenosa y alergia a los alimentos.

- 5 Ejemplos de hipersensibilidad de tipo II incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades reumáticas, enfermedades autoinmunes reumatoideas, artritis reumatoide (Krenn V. y col., 2000. *Histol Histopathol.* 15:791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel y col., 2001. *Arthritis Res.* 3:189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Erikson, J. y col., 1998. *Immunol Res.* 17:49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau Y. y col., 1999. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:156), (Chan OT. y col., 1999. *Rev. Immunol* 169:107), enfermedades glandulares, enfermedades glandulares autoinmunes, enfermedades pancreáticas autoinmunes, diabetes, diabetes de tipo I (Zimmet P. 1996. *Diabetes Res Clin Pract.* 34 supl: p125), enfermedades de la tiroides, enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. 2000. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 29:339), tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S. 2000. *J Immunol.* 165(12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. y col., *Nippon Rinsho* 1999. 57(8):1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* 1999. 57(8):1759); enfermedades autoinmunes reproductoras, enfermedades del ovario, autoinmunidad ovárica (Garza KM. y col. *J Reprod Immunol.* 1998. 37(2):87), infertilidad autoinmune contra el esperma (Diekman AB. y col., *Am J Reprod Immunol.* 2000. 43(3):134), pérdida fetal repetida (Tincani A. y col., *Lupus* 1998, 7 supl. 2:p107-9), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple (Cross AH. y col., *J. Neuroimmunol.* 2001. 112(1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. y col., *J Neural Transm Suppl.* 1997. 49:77), miastenia gravis (Infante AJ. y Kraig E. *Int Rev Immunol.* 1999. 18(1-2):83), neuropatías motoras (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci.* 2000. 7(3):191), síndrome de Guillain-Barré, neuropatías y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. *Am J Med Sci.* 2000. 319(4):234), enfermedades miasmáticas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci.* 2000. 319(4):204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia del cerebelo, atrofia progresiva del cerebelo, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. *Rev Neurol (Paris)* 2000.156(1):23), neuropatías, neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. y col., *Clin Electroencephalogr Neurophysiol Suppl.* 1999. 50:419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. y col., *Ann N Y Acad Sci.* 1998. 841:482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes cardiovasculares, aterosclerosis (Matsuura, E. y col. *Lupus.* 1998. 7 supl 2:p135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus.* 1998. 7 supl 2:p132), trombosis (Tincani A. y col., *Lupus* 1998. 7 supl 2:p107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. y col., *Wien Klin Wochenschr* 2000. 112(15-16):660); enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. y col., *Semin Thromb Hemost.* 2000. 26(2):157); vasculitis, vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis focal necrosante pauci inmune, glomerulonefritis crescénica (Noel LH. *Ann Med Interne (París).* 2000. 151(3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. y col., *J Clin Apheresis* 1999. 14(4):171), insuficiencia cardíaca, anticuerpos agonistas similares al receptor β -adrenérgico en la insuficiencia cardíaca (Wallukat G. y col., *Am J Cardiol.* 1999. 83(12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Int Med Ital.* 1999. 14(2):114), anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. y col., *Leuk Lymphoma* 1998. 28(3-4):285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad inflamatoria intestinal (García Herola A. y col., *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Ene; 23(1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000. 138(2):122), enfermedades autoinmunes de la musculatura, miositis, miositis autoinmune, síndrome de Sjogren (Feist E. y col., *Int Arch Allergy Immunol.* 2000. 123(1):92); enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. y col., *Biomed Pharmacother.* 1999. 53(5-6):234), enfermedades hepáticas, enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis autoinmune (Manns MP. *J Hepatol.* 2000. 33(2):326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg CP. y col., *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999. 11(6):595).

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo III incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades mediadas por células inmunes efectoras tales como, por ejemplo, neutrófilos o macrófagos activados, por ejemplo, por complejos inmunes a través de receptores Fc, tales como, por ejemplo, receptores Fc γ .

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo IV incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades reumáticas, artritis reumatoide (Tisch R y McDevitt HO. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. 91(2):437), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Datta SK., *Lupus* 1998. 7(9):591), enfermedades glandulares, enfermedades glandulares autoinmunes, enfermedades del páncreas, enfermedades pancreáticas autoinmunes, diabetes de tipo 1 (Castaño y L. Eisenbarth GS. *Ann. Rev. Immunol.* 8:647); enfermedades de la tiroides, enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Sakata S. y col., *Mol Cell Endocrinol.* 1993. 92(1):77); enfermedades ováricas (Garza KM. y col., *J Reprod Immunol.* 1998. 37(2):87), prostatitis, prostatitis autoinmune (Alexander RB. y col., *Urology* 1997. 50(6):893), síndrome poliglandular, síndrome poliglandular autoinmune, síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. y col., *Blood* 1991. 77(5):1127), enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple, neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. y col., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994. 57(5):544), miastenia grave (Oshima M. y col., *Eur. J. Immunol.* 1990. 20(12):2563), síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001. 98(7):3988), enfermedades cardiovasculares, autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. y col., *J Clin Invest.* 1996.

98(8):1709), púrpura trombocitopénica autoinmune (Semple JW. y col., *Blood* 1996. 87(10):4245), autoinmunidad contra linfocitos T cooperadores (Caporossi AP. y col., *Viral Immunol.* 1998. 11(1):9), anemia hemolítica (Sallah S. y col., *Ann Hematol.* 1997. 74(3):139), enfermedades hepáticas, enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis, hepatitis activa crónica (Franco A. y col., *Clin Immunol Immunopathol.* 1990. 54(3):382), cirrosis biliar, cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* 1996. 91(5):551), enfermedades néfricas, enfermedades néfricas autoinmunes, nefritis, nefritis intersticial (Kelly CJ. *J Am Soc Nephrol.* 1990. 1(2):140), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enfermedad autoinmune del oído (Yoo T.J. y col., *Cell Immunol.* 1994. 157(1):249), enfermedad del oído interno (Gloddek B. y col., *Ann N Y Acad Sci.* 1997. 830:266), enfermedades de la piel, enfermedades cutáneas, enfermedades dérmicas, dermatitis ampollosa, pénfigo vulgar, penfigoide ampollar y pénfigo foliáceo.

Ejemplos de enfermedades asociadas con la hipersensibilidad de tipo retardado incluyen, pero no se limitan a las mismas, dermatitis de contacto y exantema medicamentoso.

Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades néfricas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Ejemplos de enfermedades autoinmunes cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a las mismas, aterosclerosis (Matsuura, E. y col., *Lupus.* 1998 7 supl 2:p135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus.* 1998. 7 supl 2:p132), trombosis (Tincani A. y col., *Lupus* 1998. 7 supl 2:p107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. y col., *Wien Klin Wochenschr.* 2000. 112(15-16):660), enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. y col., *Semin Thromb Hemost.* 2000. 26(2):157), vasculitis necrosante de pequeños vasos, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis focal necrosante pauci inmune y crescénica (Noel LH. *Ann Med Interne (París).* 2000. 151(3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. y col., *J Clin Apheresis* 1999. 14 (4):171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. y col., (1999) *Am J Cardiol.* 83(12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int.* 1999. 14(2):114; Semple JW. y col, *Blood* 1996. 87(10):4245), anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. y col., *Leuk Lymphoma* 1998 28(3-4):285; Sallah S. y col., *Ann Hematol.* 1997. 74(3):139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto, E. y col., *J. Clin Invest.* 1996. 98(8):1709) y autoinmunidad contra los linfocitos T cooperadores (Caporossi AP. y col., *Viral Immunol.* 1998. 11(1):9).

Ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, artritis reumatoide (Krenn V. y col., (2000) *Histol Histopathol.* 15(3):791; Tisch R, McDevitt HO. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel y col., (2001). *Arthritis Res.* 3(3):189).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes glandulares incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades del páncreas, diabetes de tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad de ovario, infertilidad autoinmune anti-esperma, prostatitis autoinmune, y las enfermedades autoinmunes de síndrome poliglandular de tipo I incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes de tipo 1 (Castaño L. y Eisenbarth GS. 1990. *Ann. Rev Immunol.* 8:647; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996. 34 supl:p125), enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000. 29(2):339; Sakata S. y col., *Mol Cell Endocrinol.* 1993. 92(1):77), tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, *J Immunol.* 2000. 165(12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. y col., *Nippon. Rinsho* 1999. 57(8):1810), mixedema idiopática (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* 1999. 57(8):1759), autoinmunidad ovárica (Garza KM. y col., *J Immunol Reprod.* 1998. 37(2):87), infertilidad autoinmune contra el esperma (Diekman AB. y col., *Am J Reprod Immunol.* 2000. 43(3):134), prostatitis autoinmune (Alexander RB. y col., *Urology.* 1997. 50(6):893) y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. y col., *Blood.* 1991. 77(5):1127).

Ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (García Herola A. y col., *Gastroenterol Hepatol.* 2000. 23(1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000. 138(2):122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

Ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades de la piel autoinmunes ampollosas, tales como, pero no se limitan a las mismas, pénfigo vulgar, pénfigo buloso y pénfigo foliáceo.

Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, hepatitis, hepatitis autoinmune crónica activa (Franco A. y col., *Clin Immunol Immunopathol.* 1990. 54(3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* 1996. 91(5):551; Strassburg CP. y col., *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999. 11(6):595) y hepatitis autoinmune (Manns MP. *J Hepatol.* 2000. 33(2):326).

Ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, esclerosis múltiple (Cross AH. y col., *J Neuroimmunol.* 2001. 112 1-2:1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. y col., *J Neural Transm Suppl.* 1997. 49:77), miastenia gravis (Infante AJ. y Kraig E, *Int. Rev Immunol.* 1999. 18(1-2):83; Oshima M. y col.,

- 5 Eur. J. Immunol. 1990. 20:2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000. 7:191), síndrome de Guillain-Barré y neuropatías autoinmunes (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 cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. y col., Proc Natl Acad Sci USA. 2001. 98(7):3988); síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia cerebelosa progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol. (París) 2000. 156(1):23); neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. y col., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl. 1999. 50:419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. y col., Ann NY Acad. Sci. 1998. 841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. y col., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994. 57(5):544) y enfermedades neurodegenerativas.
- 10 Ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario (Feist E. y col., Int Arch Allergy Immunol. 2000. 123(1):92) y enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. y col., Biomed Pharmacother. 1999. 53(5-6):234).
- 15 Ejemplos de enfermedades néfricas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol.1990. 1(2):140).
- Ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, pero no se limitan a las mismas, pérdida fetal repetida (Tincani A. y col., Lupus 1998. 7 supl 2:p107-9).
- 20 Ejemplos de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunes del oído (Yoo TJ. y col., Cell Immunol. 1994. 157(1):249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. y col., Ann N Y Acad Sci. 1997. 830:266).
- Ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a las mismas, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. y col., Immunol Res. 1998. 17(1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. y col., Clin Diagn Lab Immunol. 1999. 6(2):156), (Chan OT. y col., Immunol Rev. 1999. 16:107).
- 25 Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a las mismas, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades parasitarias, enfermedades causadas por hongos, enfermedades por micoplasmas y enfermedades priónicas.
- 30 Ejemplos de enfermedades relacionadas con el trasplante incluyen, pero no se limitan a las mismas, rechazo del trasplante, rechazo crónico del trasplante, rechazo subagudo del trasplante, rechazo hiperagudo del trasplante, rechazo agudo del trasplante y enfermedad de injerto contra hospedador.
- Ejemplos de trasplantes incluyen los trasplantes singénicos, alotrasplantes, xenotrasplantes, trasplantes celulares, trasplantes de tejido, trasplantes de órganos e trasplantes de apéndices.
- 35 Ejemplos de trasplantes celulares incluyen, pero no se limitan a los mismos, los trasplantes de células madre, los trasplantes de células progenitoras, trasplantes de células hematopoyéticas, trasplantes de células embrionarias e trasplantes de células nerviosas.
- 40 Ejemplos de trasplantes de tejido incluyen, pero no se limitan a los mismos, los trasplantes de piel, trasplantes óseos, trasplantes de nervios, trasplantes de intestino, trasplantes de córnea, trasplantes de cartílago, trasplantes de tejido cardíaco, trasplantes de válvulas cardíacas, trasplantes dentales, trasplantes de folículos capilares e trasplantes de músculos.
- Ejemplos de trasplantes de órganos incluyen, pero no se limitan a los mismos, los trasplantes de riñón, trasplantes de corazón, trasplantes de piel, trasplantes de hígado, trasplantes de páncreas, trasplantes pulmonares e trasplantes de intestino.
- 45 Ejemplos de trasplantes de apéndices incluyen, pero no se limitan a los mismos, los trasplantes de brazos, trasplantes de piernas, trasplantes de manos, trasplantes de dedos del pie, trasplantes de dedos de la mano e trasplantes de órganos sexuales.
- 50 Ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen, pero no se limitan a las mismas, lesiones, enfermedades neurodegenerativas, úlceras, inflamación asociada con implantes de prótesis, menstruación, choque séptico, choque anafiláctico, síndrome de choque tóxico, caquexia, necrosis, gangrena, inflamación del músculo esquelético e inflamación idiopática.
- Ejemplos de implantes protésicos incluyen, pero no se limitan a los mismos, implantes mamarios, implantes de silicona, implantes dentales, implantes de pene, implantes cardíacos, articulaciones artificiales, dispositivos para la reducción de fracturas óseas, implantes de sustitución ósea, implantes de liberación de fármacos, catéteres, marcapasos, tubos respiradores y estents.

Ejemplos de úlceras incluyen, pero no se limitan a las mismas, úlceras cutáneas, llagas de cama, úlceras gástricas, úlceras pépticas, úlceras bucales, úlceras nasofaríngeas, úlceras esofágicas, úlceras duodenales, colitis ulcerosa y úlceras gastrointestinales.

5 Ejemplos de lesiones incluyen, pero no se limitan a las mismas, abrasiones, contusiones, cortes, heridas punzantes, laceraciones, heridas por impacto, conmociones cerebrales, contusiones, quemaduras térmicas, congelación, quemaduras químicas, quemaduras de sol, pérdidas por desecación, quemaduras por radiación, quemaduras de radiactividad, inhalación de humo, músculos desgarrados, tirones musculares, tendones desgarrados, tirones de tendones, tirones de ligamentos, rotura de ligamentos, hiperextensiones, desgarro de cartílago, fracturas óseas, pinzamiento de nervio y heridas de bala.

10 Ejemplos de inflamaciones músculo- esqueléticas incluyen, pero no se limitan a las mismas, inflamaciones musculares, miositis, inflamaciones de tendones, tendinitis, inflamaciones de ligamentos, inflamación del cartílago, inflamaciones articulares, inflamaciones sinoviales, síndrome del túnel carpiano e inflamaciones óseas.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un ± 10 por ciento.

15 Se espera que durante la vida de esta patente se desarrollen muchas técnicas de diagnóstico médico pertinentes y el alcance del término "detectar", cuando se refiere al antígeno diana, pretende incluir todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

20 Objetos adicionales, ventajas y características nuevas de la presente invención se harán evidentes para un experto normal en la técnica, después de un examen de los siguientes ejemplos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal y como se ha descrito anteriormente y tal y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más abajo, encuentra un soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

25 Generalmente, la nomenclatura empleada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R.M., compilador (1994); Ausubel y col., "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 y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (compiladores) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías tal y como se describen en los documentos de patentes de EE.UU. n° 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., compilador (1994); "Current Protocols in Immunology", volúmenes I-III Coligan J. E., compilador (1994); Stites y col. (compiladores), "Basic and Clinical Immunology" (octava edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (compiladores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. n° 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; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait M. J., compilador (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D. y Higgins S.J., compiladores (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D. y Higgins S.J., compiladores (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., compilador (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 y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en este documento. Los procedimientos en esta memoria se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el entendido generalmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y los materiales adecuados se describen a continuación.

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales capaces de unirse a NIK humana con afinidad/especificidad óptimas

55 Tal y como se ha descrito anteriormente, numerosas enfermedades asociadas a una regulación alterada de la actividad de NF- κ B no tienen tratamiento o tienen un tratamiento no satisfactorio, incluyendo las enfermedades cancerí-

genas y las enfermedades asociadas con respuestas inmunes patológicas, tales como enfermedades autoinmunes, alérgicas, inflamatorias, relacionadas con el trasplante. Puesto que NIK es un activador importante de NF- κ B, una estrategia de gran potencial para el tratamiento de estas enfermedades implica la identificación de anticuerpos capaces de unirse específicamente a NIK, y de este modo evitar o inhibir la activación de NF- κ B a través de NIK. Estos anticuerpos también tendrían utilidad como reactivos de detección para permitir la caracterización de aspectos normales y patológicos de procesos biológicos y bioquímicos relacionados con NIK. La técnica anterior, sin embargo, no ha proporcionado anticuerpos adecuados o apropiados de manera óptima para tales fines. Reduciendo la presente invención a la práctica, dichos anticuerpos se identificaron inesperadamente, superando así las limitaciones de la técnica anterior, tal y como se describe a continuación.

10 *Materiales y métodos:*

Producción de anticuerpos: se generaron sueros inmunes anti-NIK de murino mediante la inmunización de ratones SJL con péptidos obtenidos a partir de NIK, tal y como se ha descrito previamente [Eshhar Z. en: "Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine", capítulo 1, Springer TA. (compiladores) Timothy A., Plenum Publishing Corp., Nueva York (1985)].

15 Cada uno de la serie de péptidos que no se solapa obtenido a partir de NIK que se muestran en la Tabla 1, se utilizó para inmunizar grupos de ratones. La posición de los péptidos inmunizantes en relación con los dominios del polipéptido NIK, y la secuencia completa de aminoácidos de NIK humana que muestra la localización de los péptidos inmunizantes, se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Péptidos obtenidos a partir de NIK empleados para las inmunizaciones.

Designación del péptido*	Secuencia de aminoácidos**	SEQ ID NO:
60-76	DVITKGTAKGSEAGPA	1
86-99	CENSQEFSPTFSER	2
135-150	KGKRRSKARKKRKKKS	3
215-228	EGLRPALPRSELHK	4
363-378	RGSRSPREPSPKTEDNE	5
385-398	KLKPVDEYREEVH	6
405-420	RLGRGSFGEVHRMEDK	7
427-441	CAVKKVRLEVFRAEEL	8
509-523	RRILHGDVKADNVLL	9
605-619	CLKIASEPPPVEIP***	10
635-650	RKEPIHRVSAELGCK	11
666-681	RGEYKEPRHPPPNQAN	12
696-712	RAPGPRPAEETTGRAPK	13
720-736	EPPEPNKSPPLTLSKEE	14
752-767	PARNPSSPERKATVPE***	15
769-783	ELQQLIEIELFLNSLS	16
807-822	DDSEKNPSKASQSSRD	17
836-851	EARSSSWNMVLARGRP	18
871-885	EHLHIREFHRVKVGD	19
904-917	KDGPVRYDMEVPD	20

20 * Los números corresponden a las coordenadas de los aminoácidos del péptido dentro de la secuencia de NIK.

** Los péptidos fueron seleccionados a partir de la secuencia de NIK que tenía un residuo Cys natural en el extremo N-terminal o, en el caso de péptidos que no muestran un residuo Cys en el extremo N-terminal, se sintetizaron con un residuo Cys complementario en el extremo N-terminal y se utilizaron para las inmunizaciones.

*** Esta secuencia es muy hidrófila y puede ser difícil de producir.

25 *Producción de NIK humana recombinante:* Para la expresión de NIK humana recombinante fusionada con un marcador de afinidad myc (myc-NIK) o polihistidina (His-NIK), se transfectaron 5×10^6 , o 2×10^6 células 293-T, respectivamente, con el vector de expresión vector PCS3MTNIK que codificaba NIK marcada con Myc (secuencia de NIK como en el documento WO9737016) o pHis-NIK que codificaba NIK marcada con His, respectivamente. Las células se transfectaron según el método de fosfato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro, empleando 20 μg de ADN del vector de expresión. Veinticuatro horas después de la transfección, las células transfectadas con PCS3MTNIK o pHis-NIK se recogieron, se sedimentaron y se lisaron en 1,5 ml o 1 ml, respectivamente, de tampón para lisis de proteínas NP-40 al 1%.

35 *Inmunoprecipitación:* Para la inmunoprecipitación de la proteína de fusión recombinante de NIK procedente del lisado de proteína transfectante, utilizando suero inmune, se mezclaron 1,5 μl de suero inmune con 25 μl de perlas 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. Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces con tampón de lisis, se hirvieron en 30 μl de tampón de la muestra, y se microcentrifugaron a 15.000 rpm durante 2 minutos. El material sobre-

nadante (inmunoprecipitado) se recogió y se analizó en busca de presencia de NIK humana a través de un SDS-PAGE al 10%.

Análisis de inmunotransferencia Western: Para una transferencia de manchas en 20 pocillos, multi-escrutinio de Bio-rad, se analizó una parte alícuota de 180 µl de lisado de células 293-T transfectadas con PCS3MTNIK, mediante SDS-PAGE preparativa en gel. Como testigo positivo se utilizó anticuerpo anti-myc diluido 1:1.000.

ELISA: Material lisado procedente de células transfectadas con pHis-NIK, se diluyó 25 veces en tampón de ligación, y se utilizaron 50 µl/pocillo para el recubrimiento de los pocillos de la placa de ELISA. La detección de NIK recubierto o de péptido acoplado a BSA se realizó utilizando una dilución 1:100 de suero inmune anti-NIK, y el ensayo se desarrolló utilizando anticuerpo anti-ratón de oveja conjugado con HRP, con ABTS como sustrato enzimático. La DO₄₀₅ de las muestras se determinó después de un tiempo de reacción de 20 minutos.

Resultados experimentales: La capacidad de los anticuerpos anti-NIK disponibles en el mercado para detectar NIK se determinó a través de ensayos por inmunoprecipitación/inmunotransferencia Western de myc-NIK en lisados de proteínas de células 293-T transfectadas con PCS3MTNIK. Como puede verse en la Tabla 2, ninguno de los anticuerpos disponibles comercialmente sometidos a ensayo permite una detección óptima de NIK recombinante.

Tabla 2. Capacidad de los anticuerpos anti-NIK comercializados para detectar NIK.

Tipo de anticuerpo	Proveedor	Péptido inmunizante obtenido a partir de NIK	Ensayo*	Resultados
AcMo IgG de ratón	Santacruz	700-947	WB	NIK no detectable
policlonal de cabra	Santacruz	"N-terminal"	WB	Detección débil de NIK hiperexpresada
policlonal de conejo	Santacruz	700-947	IP, WB	Variación entre lotes. Detección moderada de NIK hiperexpresada
policlonal de conejo	Prosci Inc.	931-947	WB	Variación entre lotes. Detección moderada de NIK hiperexpresada (+)
policlonal de conejo	Pharminggen	931-947	WB	Variación entre lotes. Detección moderada de NIK hiperexpresada (++)

* WB, transferencia Western; IP, inmunoprecipitación

La capacidad de los sueros de ratones inmunizados con péptidos obtenidos a partir de NIK para detectar NIK, se analizó mediante análisis de inmunotransferencia Western sola o mediante inmunoprecipitación con proteína G de lisado de células transfectadas con PCS3MTNIK. Tal y como se muestra en la Figura 3, se observó que el antisero de ratones inmunizados con el péptido 405-420, 635-650, 666-681 o 696-712 era capaz de detectar eficazmente NIK por análisis de inmunotransferencia Western. Los péptidos 405-420 y 635-650, procedentes de los extremos amino y carboxi terminales del dominio cinasa de NIK, respectivamente, se encontró que eran muy eficaces para obtener anticuerpos excelentes para el análisis de inmunotransferencia Western. El péptido 666-681 procedente de los extremos carboxi terminales del dominio cinasa de NIK y 696-712 de la región C-terminal, respectivamente, también se observó que eran apropiados para la preparación de anticuerpo adecuada para el análisis de inmunotransferencia Western (Figuras 1 y 2 y la Tabla 3).

Tal y como se muestra en las Figuras 4a-d, cuando myc NIK se inmunoprecipitaba con cada uno de los diferentes anticuerpos preparados a partir de lisados, antes del análisis de inmunotransferencia Western (utilizando anti-myc para la detección en el análisis de inmunotransferencia Western), se observó que los antiseros de ratones inmunizados con el péptido 60-76, 86-99, 135-150, 215-228 o (Figura 4a); 363-378, 385-398 o 405-420 (Figura 4b); 427-441, 509-523, 605-619, 635-650, 666-681 o 696-712 (Figura 4c); o 752-767 o 807-822 (Figura 4d) tenían cada uno la capacidad de inmunoprecipitar a NIK (mostrada por la flecha). La capacidad de los sueros inmunes para detectar a NIK también se analizó por ELISA en un lisado de células transfectadas con pHis-NIK.

Se observó que los anticuerpos preparados utilizando péptidos procedentes de la subregión C-terminal del dominio cinasa 635-650, o del dominio C-terminal de NIK 666-581, 696-712 y 752-767 eran extremadamente eficaces para la inmunoprecipitación de NIK (Tabla 3). Tal y como se muestra en la Figura 5, se observó que el suero de ratones inmunizados con el péptido 427-441 era capaz de detectar NIK con una sensibilidad muy alta a través de ELISA. Se observó que el suero de los ratones inmunizados con los péptidos 60-76, 86-99, 135-150, 215-228, 363-378, 385-398, 405-420, 509-523, 605-619, 635-650, 666-681, 696-712, 752-767, 836-851, 871-883 o 904-917 también era capaz de detectar claramente NIK a través de ELISA.

Así, tal y como se resume en la Tabla 3, los anticuerpos descritos a continuación tienen la capacidad de detectar de manera eficaz NIK humana o porciones específicas de la misma, a través de análisis de inmunotransferencia Western, ensayo IP/ inmunotransferencia Western y/o ELISA.

Se observó que el anticuerpo preparado usando la subregión C-terminal de la cinasa de NIK era excelente en ambos lotes de análisis de inmunotransferencia Western e inmunoprecipitación de NIK.

De forma decisiva, la capacidad de los anticuerpos descritos a continuación para unirse específicamente a:

(i) la secuencia de aminoácidos 60-76 (SEQ ID NO: 1), 86-99 (SEQ ID NO: 2), 135-150 (SEQ ID NO: 3), 215-228 (SEQ ID NO: 4), 363-378 (SEQ ID NO: 5) o 385-398 (SEQ ID NO: 6) de la región amino-terminal de NIK;

(ii) la secuencia de aminoácidos 401-681 de NIK (SEQ ID NO: 22), que comprende la región cinasa completa (residuos de aminoácidos 401-681);

5 (ii) la secuencia de aminoácidos 405-420 (SEQ ID NO: 7), 427-441 (SEQ ID NO: 8), 509-523 (SEQ ID NO: 9), 605-619 (SEQ ID NO: 10) o 635-650 (SEQ ID NO: 11) de la región cinasa de NIK; o

10 (iv) los residuos de aminoácidos 666-681 (SEQ ID NO: 12), 696-712 (SEQ ID NO: 13), 752-767 (SEQ ID NO: 15), 807-822 (SEQ ID NO: 17), 836-851 (SEQ ID NO: 18), 871-885 (SEQ ID NO: 19) o 904 a 917 (SEQ ID NO: 20) de la región carboxi-terminal de NIK, es única en comparación con anticuerpos anti-NIK de la técnica anterior (compárese con la Tabla 2).

Tabla 3. Resumen de las capacidades de unión de los sueros anti-NIK generados

Origen del péptido inmunizante en NIK*	Subregión	Denominación del péptido	Ensayo de detección		
			Western	IP**	ELISA
región N-terminal		60-76 (SEQ ID NO: 1)		+	+
		86-98 (SEQ ID NO: 2)		+	+
		135-150 (SEQ ID NO: 3)		+	+
		215-228 (SEQ ID NO: 4)		+	+
		363-378 (SEQ ID NO: 5)		+	+
		385-398 (SEQ ID NO: 6)		+	+
dominio cinasa	N-terminal	405-420 (SEQ ID NO: 7)	+++	+++	+
		427-441 (SEQ ID NO: 8)		+	+++
		509-523 (SEQ ID NO: 9)		+	+
		605-619 (SEQ ID NO: 10)		+	+
	C-terminal	635-650 (SEQ ID NO: 11)	+++	+++	+
región C-terminal		666-681 (SEQ ID NO: 12)	++	+++	+
		696-712 (SEQ ID NO: 13)	+	+++	+
		752-767 (SEQ ID NO: 15)		+++	+
		836-851 (SEQ ID NO: 18)		+	+
		871-885 (SEQ ID NO: 19)		+	+
		904-917 (SEQ ID NO: 20)		+	+

* las regiones N-terminal, cinasa y C-terminal de NIK, se corresponden respectivamente a los residuos de aminoácidos 1-400, 401-653 y 654-947 de la secuencia de NIK; ** IP, inmunoprecipitación

15 Después de una amplia experimentación, se generaron inesperadamente numerosas preparaciones de anticuerpos, siendo cada una capaz de unirse de manera óptima a un epítipo de NIK altamente específico, tal como un epítipo de una región cinasa, amino terminal, o carboxi-terminal. En particular, la capacidad de las preparaciones de anticuerpos descritas a continuación para unirse específicamente a la región cinasa de NIK, o para unirse específicamente a cualquiera entre diversas porciones específicas de la cinasa, o a las regiones amino o carboxi-terminales de NIK, es única en comparación con todos los anticuerpos que se unen a NIK de la técnica anterior. Anticuerpos destacados que son capaces de una detección eficaz de NIK en el análisis de inmunotransferencia Western, en donde se prepararon con la subregión N-terminal o C-terminal del dominio cinasa de NIK, o de una detección eficaz de NIK mediante ELISA, se prepararon con el péptido del dominio cinasa 427-441, o de la detección eficaz de NIK por inmunoprecipitación se prepararon utilizando péptidos del dominio C-terminal de NIK incluyendo la subregión C-terminal del dominio cinasa (ver Tabla 3). Así, los anticuerpos descritos a continuación se pueden utilizar para la regulación de una actividad bioquímica, tal como una actividad cinasa, de NIK. Puesto que tal actividad es necesaria para la activación de NF-κB, las preparaciones de anticuerpos descritos a continuación se pueden utilizar para regular de forma óptima la activación de NF-κB, y puesto que una regulación alterada de la actividad de NF-κB está asociada con la patogénesis de numerosas enfermedades, tales como las asociadas con respuestas inmunes patológicas, y con diversas enfermedades cancerígenas, las preparaciones de anticuerpos descritos a continuación se pueden utilizar para tratar de forma óptima tales enfermedades. Además, ya que: (i) al permitir una detección única y eficaz de la región cinasa de NIK, o de una porción de la región cinasa de NIK; y (ii) al permitir la detección o la detección óptima de NIK, o de cualquiera entre diversas porciones específicas de las regiones carboxi o amino-terminales de NIK, las preparaciones de anticuerpos descritas a continuación se pueden explotar para caracterizar o caracterizar de manera óptima, aspectos de procesos/estados normales/patológicos, biológicos/bioquímicos, relacionados con NIK o con porciones específicas de la misma.

Preparación de anticuerpos monoclonales

40 Los anticuerpos monoclonales se prepararon tal y como se describe en Eshhar Z. en: "Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine", Capítulo 1, Springer TA. (compiladores) Timothy A., Plenum Publishing Corp., Nueva

York (1985)], empleando el bazo de ratones positivos inoculados con péptido de SEQ ID NO: 7, 11 y 12 del extremo N-terminal y C-terminal de la cinasa para fusión.

El material sobrenadante de cultivos de tres hibridomas, desarrollados contra los péptidos de NOs: 7, 11 y 12 del extremo N-terminal y C-terminal de la cinasa (Pep 7 81.1, Pep 11 355.8 y Pep 12 629 62 18), Pep 12 está en el comienzo del extremo C-terminal, se sometieron a ensayo con análisis de inmunotransferencia Western. Por lo tanto, 1,5 x 10⁶ células 293-T se sembraron en placas de 10 cm y se transfectaron después de 24 horas con pCS3MTNIK (que codifica NIK marcada con myc). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se recogieron y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis NP40 al 1%. Se cargaron 40 µl del lisado en cada pista en SDS-PAGE al 10% junto con lisado de células transfectadas con pcDNA3 como testigo. Las transferencias Western se sometieron a ensayo con el material sobrenadante del cultivo del hibridoma respectivo en una dilución 1:500. Los resultados resumidos en la Fig. 6 muestran que los anticuerpos monoclonales, diseñados contra los péptidos NOs: 7, 11 y 12 del extremo N-terminal y C-terminal de la cinasa, de manera similar a los anticuerpos policlonales homólogos, son capaces de detectar NIK en análisis de inmunotransferencia Western.

El material lisado de 293-T que expresa la proteína NIK marcada con myc, también se utilizó para someter a ensayo la capacidad de inmunoprecipitar de los mismos tres anticuerpos monoclonales antiNIK: Pep 7 81.1, Pep 11 355.8 y Pep 12 629 62 18. Se mezclaron 50 µl de perlas con proteína G con 500 µl de material sobrenadante del cultivo del hibridoma y se incubaron a aproximadamente 22°C durante 1 hora. Las perlas se lavaron con tampón de lisis NP-40 al 1% tres veces y se utilizaron para la inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación (IP) se llevó a cabo durante 2 horas a +4°C. Después de la IP, las perlas se lavaron tres veces y se hirvieron con 50 µl de tampón Laemli y 25 µl de material sobrenadante se cargó en un SDS-PAGE al 10% (Fig. 7).

Los resultados resumidos en la Figura 7 muestran que todos los anticuerpos monoclonales sometidos a ensayo fueron capaces de inmunoprecipitar a NIK, excepto el testigo negativo de IgG (Fig. 7 pista 7). El anticuerpo purificado por afinidad desde la ascitis, era superior al anticuerpo purificado a partir del material sobrenadante de hibridoma (comparar las pistas 1 y 4 en la Fig. 7).

Detección de NIK endógena.

Para explorar la posibilidad de detectar NIK endógena, se lisaron células Ramos (2-4 x 10⁸, 1 x 10⁸ células/ml) y NIK se inmunoprecipitó con ascitis de NIK de ratón purificada por afinidad, que contenía el anticuerpo NIK-81 purificado (es decir, el anticuerpo monoclonal Pep7 81.1) acoplado a las perlas de Sefarosa-proteína-G (acoplado tal y como se ha descrito anteriormente). El anticuerpo NIK-81 se purificó a partir de fluidos ascíticos de ratón, en columnas de afinidad, a las que se acopló el péptido utilizado para preparar el anticuerpo (SEQ ID NO: 7).

Los anticuerpos se purificaron a partir del líquido ascítico mediante purificación por afinidad, utilizando perlas de Affigel (Affigel 15 Biorad) reticuladas con BSA (Pierce Cat. 77116), acopladas al péptido sintético utilizado para la inmunización de los ratones (péptido en SEQ ID NO: 7). Un ml de Affigel 15 se lavó tres veces con agua fría destilada dos veces, con 10 ml cada vez. El Affigel lavado se mezcló con 1 ml de péptido BSA enfriado a 4 grados durante 12-16 horas en un rotador. El bloqueo del éster se llevó a cabo mediante la adición de 100 microlitros de etanolamina 1 M (pH 8,0)/ml de gel y se incubó durante una hora a 4 grados en el rotador.

Para la purificación de los anticuerpos, la ascitis precipitada con sulfato de amonio al 50% se dializó frente a PBS durante 1630 horas a 4°C. Después de la diálisis, las partes alícuotas se incubaron con 1 ml de perlas procesadas de Affigel-BSA-péptido durante 12-16 horas a 4°C y las perlas preincubadas se utilizaron para empaquetar una columna de 1 ml. Inicialmente, la columna se lavó con 10 ml de PBS, seguido de un lavado con Tris 10 mM pH 7,5, que contenía NaCl 1 M y un lavado con PBS. Los anticuerpos eluyeron de la columna con una solución que contenía glicina HCl 100 mM pH 2,7 y NaCl 0,5 M. Fracciones de 1 ml se recogieron en tubos que contenían 40 µl de Tris base para la neutralización del eluyente. A partir de 25 ml de ascitis se obtuvieron aproximadamente 5-13,6 mg de anticuerpos purificados.

La proteína inmunoprecipitada se detectó mediante análisis de transferencia Western, utilizando el anticuerpo NIK-81 y el kit de detección quimioluminiscente de SuperSignal West Femto (Pierce). NIK (y para comparar, IKK1) fue visualizada en células Ramos carentes de NIK (que expresan constitutivamente pSUPER-NIK de lentivirus) y en células Ramos que contenían NIK endógena (transducidas con GFP de lentivirus). Los resultados obtenidos (Fig. 8) muestran que el anticuerpo NIK-81 es capaz de una inmunoprecipitación eficaz de NIK endógena y de una detección en el análisis de inmunotransferencia Western.

Detección de NIK de múrido con el anticuerpo NIK-81.

Ya que los anticuerpos de múridos son herramientas valiosas para la investigación *in vivo*, sobre todo en modelos de múridos, se exploró si el anticuerpo monoclonal NIK 81, es capaz de detectar NIK de múrido. Para tal fin, se transfectaron células HeLa (1,2 x 10⁶ células sembradas en una placa Petri de 9 cm) con 5 mcg de plásmido, que codificaba NIK humana (hNIK) o de ratón (mNIK), o con fragmentos respectivos de las mismas (hNIK 188-947 y mNIK 87-942) o con un testigo de plásmido vacío (pCHIS), por el método de precipitación con fosfato cálcico. Veinticuatro horas después de la transfección, se analizaron los lisados celulares totales en busca de NIK humana o de ratón transitoria hiperexpresada, mediante análisis de inmunotransferencia Western con el anticuerpo anti NIK 81 (líquido

ascítico, dilución 1:5000).

Los resultados resumidos en la Figura 9 muestran que el anticuerpo monoclonal anti NIK 81 es capaz de unirse y detectar, NIK humana, NIK de múrdo y fragmentos de las mismas.

- 5 Los clones de los hibridoma Pep 7-81.1, Pep 11-355.8 y Pep 12-629-62-18 fueron depositados el 2 de octubre de 2003 en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, París, en el marco del Tratado de Budapest y se otorgaron los números de depósito I-3092, I-3093, I-3094, respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> XXXINVENTORES
 <120> ANTICUERPOS ANTI-NIK Y SUS USOS
 <130> 25831
 5 <160> 22
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 15 <400> 1
Asp Val Ile Thr Lys Gly Thr Ala Lys Glu Gly Ser Glu Ala Gly Pro
1 5 10 15
 Ala
 <210> 2
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 2
Cys Glu Asn Ser Gln Glu Phe Ser Pro Thr Phe Ser Glu Arg
1 5 10
 <210> 3
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 35 <400> 3
Lys Gly Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Ser
1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45 <400> 4
Glu Gly Leu Arg Pro Ala Leu Pro Arg Ser Glu Leu His Lys
1 5 10
 <210> 5

ES 2 385 830 T3

- <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Péptido sintético
- <400> 5
- Arg Gly Ser Arg Ser Arg Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu**
 1 5 10 15
- 10 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Péptido sintético
- <400> 6
- Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His**
 1 5 10
- 20 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Péptido sintético
- <400> 7
- Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg Met Glu Asp Lys**
 1 5 10 15
- 30 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Péptido sintético
- <400> 8
- Ala Val Lys Lys Val Arg Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu**
 1 5 10 15
- 40 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Péptido sintético
- <400> 9
- Arg Arg Ile Leu His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu**
 1 5 10 15
- 50 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 10

Ile Ala Ser Glu Pro Pro Pro Val Arg Glu Ile Pro
 1 5 10

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 11

Arg Lys Glu Pro Ile His Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 12

Arg Gly Glu Tyr Lys Glu Pro Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 13

Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Glu Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 14

Glu Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu Glu
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 385 830 T3

<400> 15

Pro Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu
1 5 10 15

<210> 16

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

<400> 16

Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser
1 5 10 15

<210> 17

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<400> 17

Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys Ala Ser Gln Ser Ser Arg Asp
1 5 10 15

<210> 18

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido sintético

<400> 18

Glu Ala Arg Ser Ser Ser Trp Asn Met Val Leu Ala Arg Gly Arg Pro
1 5 10 15

<210> 19

35 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido sintético

<400> 19

Glu His Leu His Ile Arg Glu Phe His Arg Val Lys Val Gly Asp
1 5 10 15

<210> 20

45 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<400> 20

ES 2 385 830 T3

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

ES 2 385 830 T3

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

ES 2 385 830 T3

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

ES 2 385 830 T3

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> 22

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido recombinante que se corresponde a los aa 401-681 de la secuencia de NIK humana

10 <400> 22

ES 2 385 830 T3

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

se proporciona una porción específica de la secuencia de aminoácidos.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación que comprende anticuerpos policlonales y/o fragmentos $F(ab')_2$ de los mismos, en donde los anticuerpos se dirigen contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7
- 5 2. La preparación de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos son anticuerpos IgG.
3. La preparación de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tienen origen múrido.
4. La preparación de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, capaz de detectar específicamente la cinasa que induce NF- κ B (NIK) mediante
 - 10 (a) análisis por inmunotransferencia Western;
 - (b) ELISA; o
 - (c) inmunoprecipitación.
5. La preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los anticuerpos se preparan inmunizando un mamífero no humano con un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 7.
 - 15 6. La preparación de acuerdo con la reivindicación 5, capaz de detectar NIK de múrido.
 7. La preparación de acuerdo con la reivindicación 5, preparada inmunizando un roedor.
 8. Un método para preparar un anticuerpo monoclonal anti-NIK que comprende la inmunización de un mamífero con un péptido, que forma parte de la secuencia de aminoácidos de NIK, y que es SEQ ID NO: 7.
 - 20 9. El anticuerpo monoclonal anti-NIK producido por el clon del hibridoma Pep 7-81.1, depositado en la CNCM con el número I-3092.
 10. Un clon de hibridoma depositado en la CNCM con el número I-3092.
 11. Una composición de materia que comprende un sustrato fijado de manera covalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, capaz de capturar selectivamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a SEQ ID NO: 7.
 - 25 12. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho sustrato es una matriz de cromatografía de afinidad.
 13. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en la que dicho sustrato comprende un hidrato de carbono o un derivado de dicho hidrato de carbono.
 - 30 14. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho hidrato de carbono se selecciona entre el grupo consistente en agarosa, sefarosa y celulosa.
 15. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho sustrato se selecciona entre el grupo que consiste en una perla, una resina o una superficie de plástico.
 - 35 16. Un método para preparar un anticuerpo monoclonal anti-NIK que comprende hacer crecer el clon de hibridoma Pep 7-81.1, depositado en la CNCM con el número I-3092 en un medio líquido o en el abdomen de un mamífero para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.
 17. Un método *in vitro* para la purificación de una proteína que se une a NIK, que comprende poner en contacto una muestra que contiene NIK y la proteína que se une a NIK con una preparación de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, coinmunoprecipitar NIK y la proteína que se une a NIK, lavar el complejo inmune producido y recuperar la proteína que se une a NIK desde el complejo inmune empleando un péptido competidor obtenido a partir de NIK.
 - 40 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la muestra se selecciona a partir de fluidos corporales, extractos celulares y genotecas de expresión de ADN.
 19. Uso de una preparación de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para el desarrollo de un ensayo ELISA.
 - 45 20. Uso de una preparación de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para la purificación inmune de NIK.

Figura 1

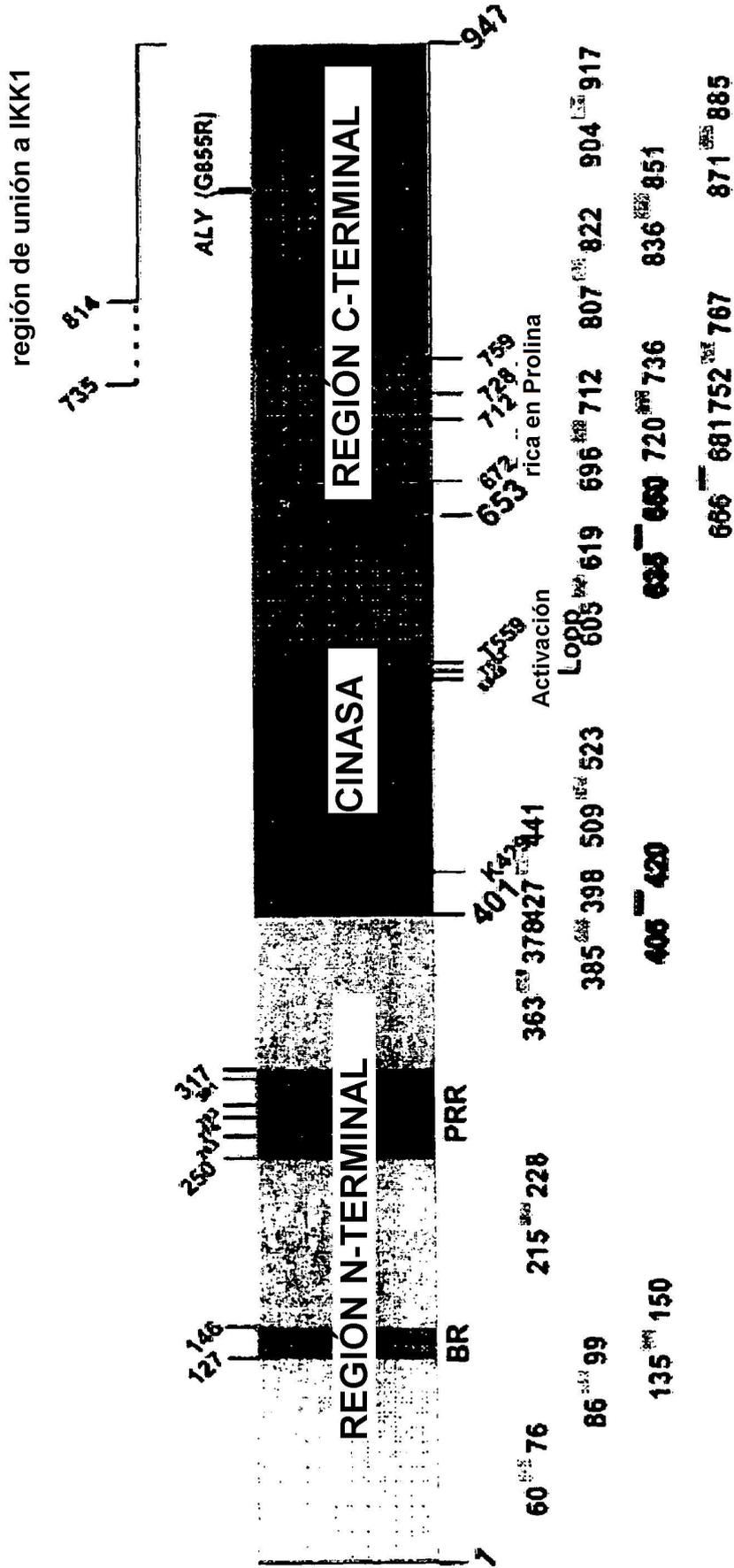


Figura 2

1	MAVMEMACPG	APGSAVGQQK	ELPKPKEKTP	PLGKKQSSVY	KLEAVEKSPV	50
51	FCGKWEILND	VITKGTAKEG	SEAGPAAISI	IAQAECENSQ	EFSPTFSERI	100
101	FIAGSKQYSQ	SESLDQIPNN	VAHATEGKMA	RVCWKGKRRS	KARKKRKKKS	150
151	SKSLAHAGVA	LAKPLPRTPE	QESCTIPVQE	DESPLGAPYV	RNTPQFTKPL	200
201	KEPGLGQLCF	KQLGEGLRPA	LPRSELHKLI	SPLQCLNHVW	KLHHPQDGGP	250
251	LPLPTHPPFY	SRLPHPPFFH	PLQPWKPHPL	ESFLGKLACV	DSQKPLPDPH	300
301	LSKLACVDSP	KPLPGPHLEP	SCLSRGAHEK	FSVEEYLVA	LQGSVSSSQ	350
351	HSLTSLAKTW	AARGSRREP	SPKTEDNEGV	LLTEKLPVD	YEYREEVHWA	400
401	THQLRLGRGS	FGEVHRMEDK	QTGFQCAVKK	VRLEVFRAEE	LMACAGLTSP	450
451	RIVPLYGAVR	EGPWVNI FME	LLEGGSLGQL	VKEQGCLPED	RALYYLGQAL	500
501	EGLEYLHSRR	ILHGDVKADN	VLLSSDGSHA	ALCDFGHAVC	LQPDGLGKSL	550
551	LTGDYIPGTE	THMAPEVVLG	RSCDAKVDVW	SSCCMLHML	NGCHPWTQFF	600
601	RGPLCLKIAS	EPPVREIPP	SCAPLTAQAI	QEGLRKEPIH	RVSAAEELGK	650
651	VNRALQOVGG	LKSPWRGEYK	EPRHPPNQA	NYHQTSHAQP	RELSPRAPGP	700
701	RPAEETTGRA	PKLOPPLPPE	PPEPNKSPPL	TLSEESGMW	EPLPLSSLEP	750
751	APARNPSSPE	RKATVPEQEL	QQLEIELFLN	SLSQPFSL	QEQILSCLSI	800
801	DSLSLSDDE	KNPSKASQSS	RDTLSSGVHS	WSSQAEARSS	SWNMVLARGR	850
851	PTDTPSYFNG	VKVQIQSLNG	EHLHIREFHR	VKVGDIATGI	SSQIPAAAFS	900
901	LVTKDGQVPR	YDMEVPDSGI	DLQCTLAPDG	SFAWSWRVKH	GQLENRP	947

Figura 3

Péptido obtenido a partir de NIK empleado para la inmunización

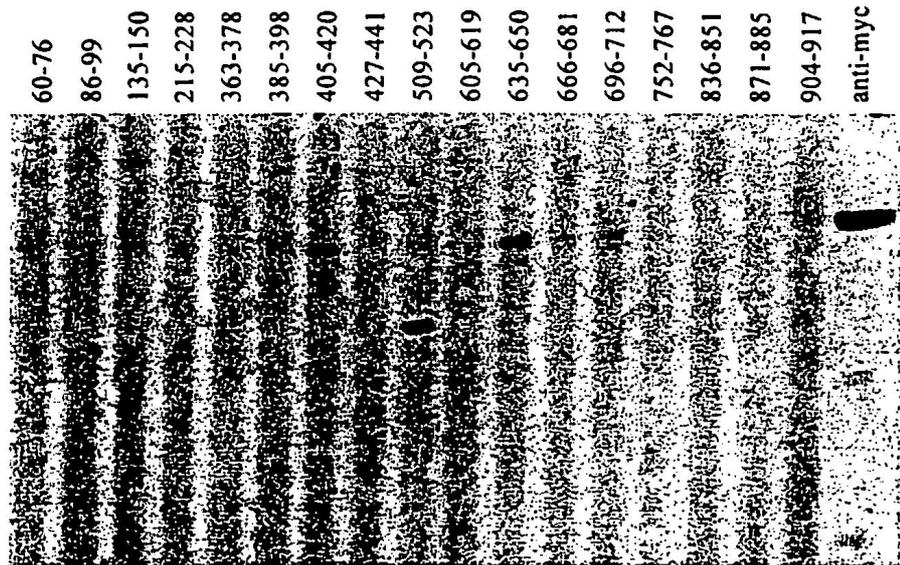


Figura 4

Fig. 4a

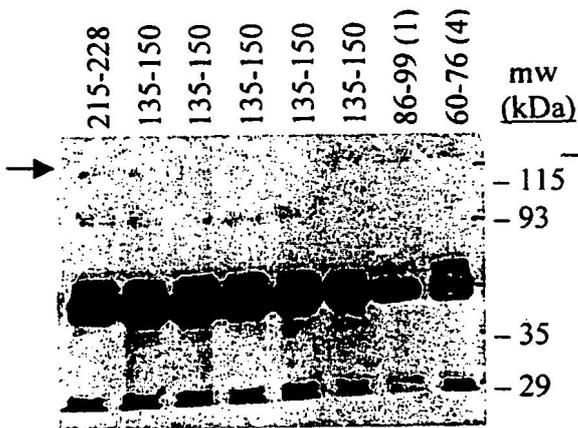


Fig. 4b

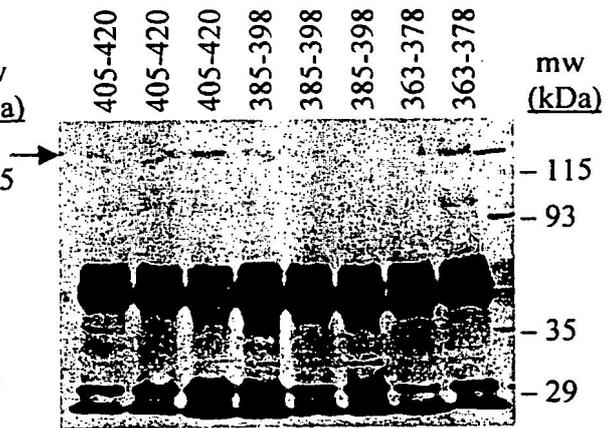


Fig. 4c

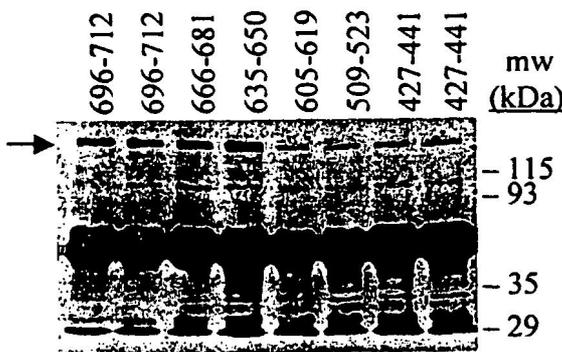


Fig. 4d

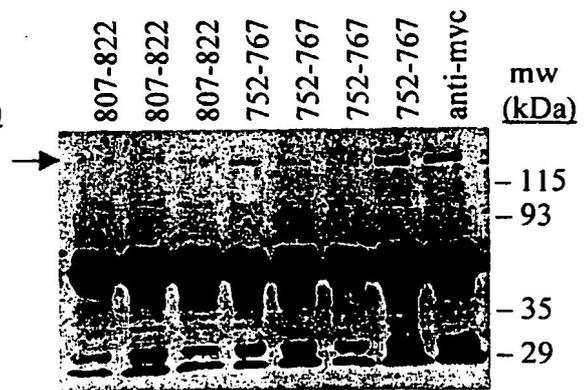


Figura 5

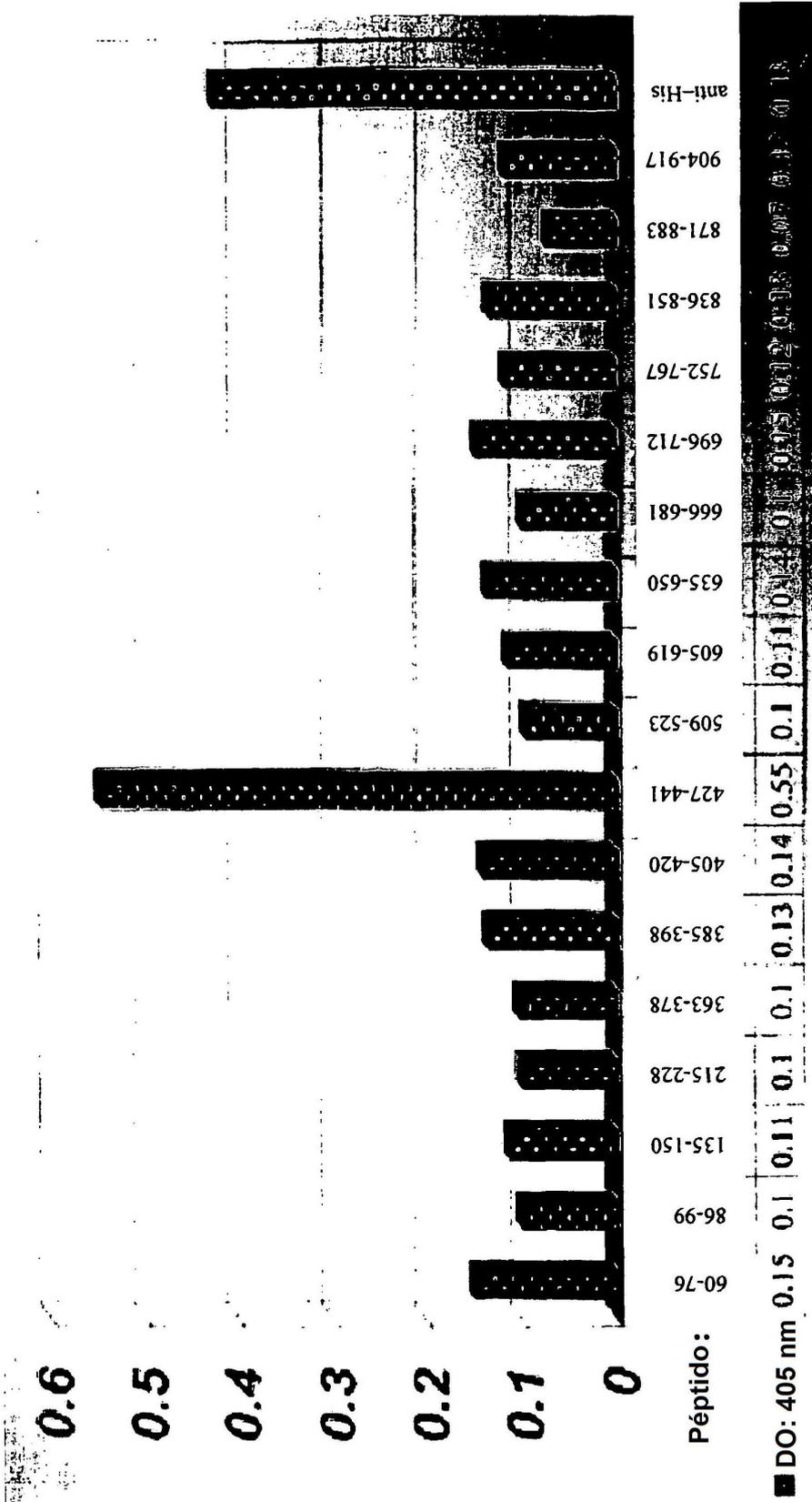


Figura 6

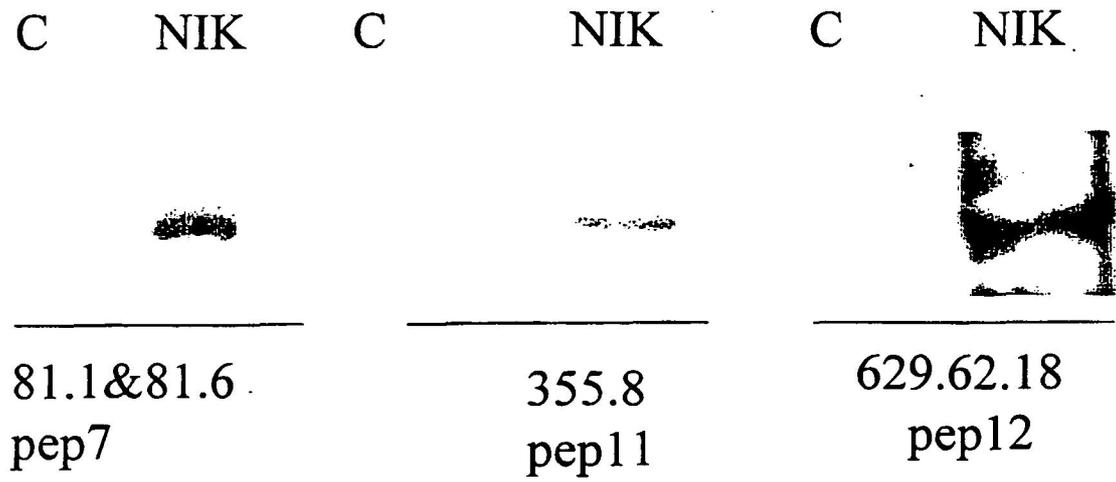


Figura 7

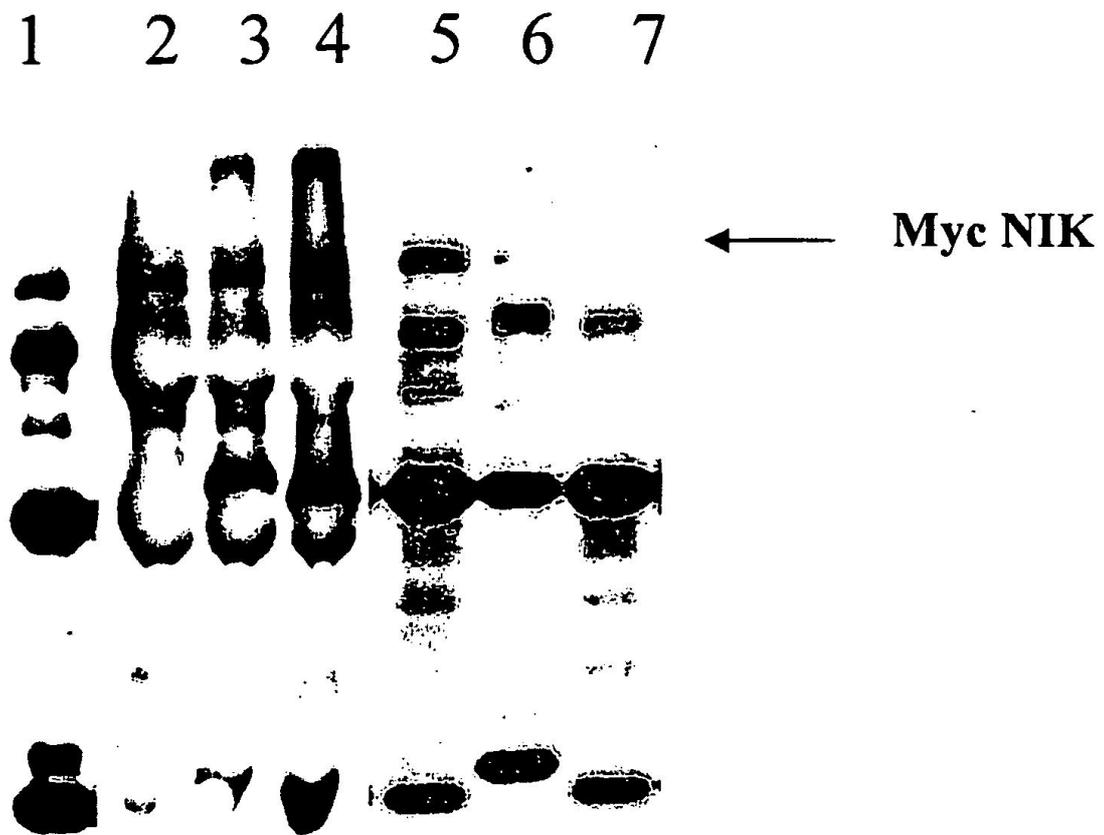


Figura 8

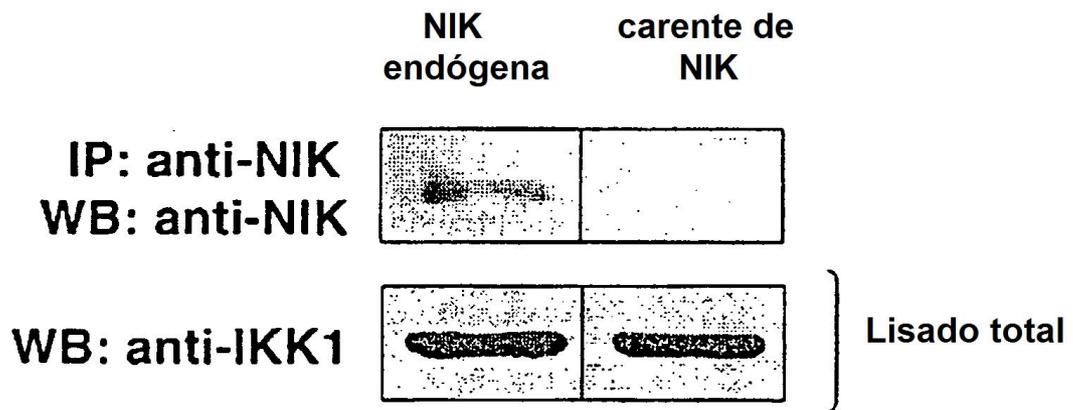


Figura 9

