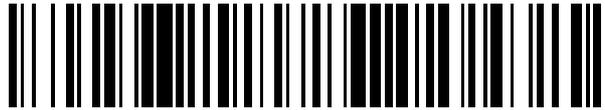


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 065**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2004 E 10178190 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2322561**

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

30 Prioridad:

**07.10.2003 IL 15828703**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.01.2014**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,  
LTD. (100.0%)  
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 2 437 065 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**

La presente invención se refiere a moléculas inmunorreguladoras. Más en particular, la presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tal y como se definen en las reivindicaciones capaces de fijarse específicamente a la cinasa que induce el NF- $\kappa$ B (NIK)/MAP3K14, o a una porción específica de la misma.

**Antecedentes de la invención**

No existe tratamiento ni ningún tratamiento satisfactorio para las numerosas enfermedades muy debilitadoras y/o mortales asociadas a una falta de regulación de la actividad de las moléculas de NF- $\kappa$ B, entre ellas las enfermedades malignas y las enfermedades asociadas a respuestas inmunitarias patológicas, tales como enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con trasplantes.

Las moléculas de la familia de la NF- $\kappa$ B son complejos que actúan como factores de transcripción eucariotas decisivos para la regulación de las respuestas inmunitarias, del crecimiento celular y de la supervivencia (Ghosh S. et al., 1998. *Annu Rev Immunol.* 16: 225-60) que se pueden activar por inducción mediante casi todos los miembros de la familia de receptores de TNF/NGF. Las moléculas de NF- $\kappa$ B suelen estar aisladas en el compartimento citoplasmático mediante asociación física a una familia de inhibidores citoplasmáticos ricos en ankirina denominados I $\kappa$ B, que incluyen I $\kappa$ B $\alpha$  y proteínas relacionadas (Baldwin A. S. Jr., 1996. *Annu Rev. Immunol.* 14: 649-83). En respuesta a los diversos estímulos, que incluyen citocinas, mitógenos y determinados productos génicos víricos, el I $\kappa$ B se fosforila rápidamente en la Ser32 y en la Ser36 y se ubiquitina, y se degrada posteriormente en el proteasoma 26S. Esto permite que el NF- $\kappa$ B liberado 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). Los recientes estudios de clonación molecular han identificado un complejo cinasa de I $\kappa$ B (IKK) con varias subunidades que interviene en la fosforilación de I $\kappa$ B, el inhibidor de NF- $\kappa$ B, inducida por señal. El complejo IKK está compuesto por dos subunidades catalíticas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y una subunidad reguladora IKK $\gamma$  (NEMO). La actividad catalítica de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  se puede activar mediante muchos inductores diferentes de NF- $\kappa$ B, entre ellos las citocinas inflamatorias tales como el factor de la necrosis tumoral (TNF) y la interleucina (IL)-1, el receptor de los linfocitos T (TCR) y la proteína coestimuladora de los linfocitos T, CD28 (Karin, M. y Ben-Neriah, Y., 2000. *Annu Rev Immunol.* 18: 621-63).

La cinasa que induce el NF- $\kappa$ B (NIK, por su nombre en inglés)/MAP3K-14 (Publicación de patente internacional de la WIPO n.º WO9737016A1 para los presentes inventores) es decisiva para la activación del NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de la NIK conduce a una activación considerable del NF- $\kappa$ B (revisado en Wallach D. et al., 2002. *Arthritis Res* 4 Supl 3: S189-96) y se ha demostrado que la expresión de mutantes de NIK catalíticamente inactivos conduce a una inhibición eficaz de la activación del NF- $\kappa$ B en respuesta a una serie de activadores conocidos de NF- $\kappa$ B, tales como LMP1, receptor del TNF (TNFR)-1, TNFR-2, RANK, receptor Toll humano, CD3/CD28, receptor de la IL-1 (IL-1R), proteína Tax del virus linfótopo de los linfocitos T humanos (HTLV)-1 y lipopolisacárido (LPS) (Malinin, N. L. et al., 1997. *Nature* 385: 540-4, Sylla, B. S. et al., 1998. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 10106-11; Darnay, B. G. et al., 1999. *J Biol Chem.* 274: 7724-31; Lin, X. et al., 1999. *Immunity* 10: 271-80; Geleziunas, R. et al., 1998. *Mol Cell Biol.* 18: 5157-65). La interrupción selectiva del gen de la NIK (Yin, L. et al., 2001. *Science* 291: 2162-5) y el estudio de la cepa de ratón de la 'alinfoplasia' (aly) que lleva una mutación natural puntual de aminoácido Gly855Arg en la NIK (Shinkura, R. et al., 1999. *Nat Genet.* 22: 74-7) reveló que la NIK tiene una función esencial en el desarrollo de los órganos linfáticos. Los ratones aly/aly y con genosupresión del gen de la NIK manifiestan una ausencia sistémica de ganglios linfáticos y de placas de Peyer, desorganización de la estructura del timo y del bazo e inmunodeficiencia cuyas características más destacables son poca cantidad de inmunoglobulinas en el suero y ausencia de rechazo al injerto (Shinkura R. et al., 1999. *Nat Genet.* 22: 74-7). Estas anomalías reflejan aparentemente la señalización aberrante de una serie de receptores. Las deficiencias de desarrollo de los ratones con NIK mutante se parecen a las encontradas en los ratones carentes del receptor de LT- $\beta$  (LT- $\beta$ R), lo que sugiere que la NIK también participa en la señalización mediante este receptor concreto. La peor capacidad proliferativa de los linfocitos B en los ratones aly/aly se pudo demostrar que estaba correlacionada con una falta de respuesta de estas células al LPS y al ligando de CD40 (CD40L; Garceau, N. et al. 2000. *J. Exp Med.* 191: 381-6) y la presencia de una cantidad excesiva de linfocitos B1 en la cavidad del peritoneo de los ratones se podría adscribir a la falta de migración dirigida de las células peritoneales al sistema de tejidos linfáticos asociados a la mucosa intestinal (GALT, por su nombre en inglés) como una consecuencia de una señalización deficiente del receptor de las quimiocinas en el tejido linfático secundario (Fagarasan, S. et al., 2000. *J. Exp Med.* 191: 1477-86).

Recientemente, en los estudios realizados por Wallach et al., se ha demostrado que NIK interviene de forma general e importante en la señalización del receptor de las citocinas, y estos autores han demostrado, utilizando un sistema de doble híbrido, que la cadena  $\gamma$  del receptor de la IL-2, o una «cadena  $\gamma$  común», que es una componente de la señalización de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21, está asociada específicamente a la NIK (PCT/IL 03/00317). La sobreexpresión de la cadena  $\gamma$  común se encontró que potenciaba la activación del NF- $\kappa$ B mediada por NIK y, tras la estimulación con IL-2 o IL-15, se encontró que NIK y los componentes del señalosoma se

fijan a la cadena y común. Por lo tanto, estos resultados indican que NIK interviene en la señalización a través de la gran variedad de receptores de citocinas que comprenden la cadena y común como subunidad de señalización.

Aparte de estas y otras contribuciones a la regulación del desarrollo y el funcionamiento del sistema inmunitario, la NIK también participa en la regulación de diferentes funciones no inmunitarias. Los ratones *aly/aly* (pero no la genosupresión de NIK) presentan un desarrollo deficiente de las glándulas mamarias (Miyawaki S. et al., 1994. *Eur J. Immunol.* 24: 429-34). Además, los estudios *in vitro* han implicado a la NIK en la señalización que conduce a la diferenciación de las células del músculo esquelético (Canicio, J. et al. 2001. *J Biol Chem.* 276: 20228-33) y a la supervivencia y diferenciación de las neuronas (Foehr. E. D. et al., 2000. *J. Biol. Chem.* 275: 34021-4).

En concordancia con la función que se le ha asignado a la NIK como mediadora de la activación del NF- $\kappa$ B, los fibroblastos procedentes de ratones *aly/aly* y con genosupresión de NIK no lograron activar el NF- $\kappa$ B en respuesta a la activación de LT- $\beta$ R. Además, la inducción de VCAM-1 debida a LT- $\beta$ R, que se produce por la activación del NF- $\kappa$ B, es anormal en los fibroblastos embrionarios de ratones *aly/aly* (FER; Matsumoto, M. et al., 1999. *J. Immunol.* 163: 1584-91). También se ha observado la falta de fosforilación de I $\kappa$ B en la respuesta de los linfocitos B de *aly/aly* a la ligación del CD40. En cambio, en las células dendríticas de estos ratones, la fosforilación de I $\kappa$ B inducida por CD40 aparecía normal (Garceau, N. et al. 2000. *J. Exp Med.* 191: 381-6). Las células peritoneales de *aly/aly* también son incapaces de responder a la quimiocina SLC con un incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B (Fagarasan, S. et al. 2000. *J Exp Med.* 191: 1477-86).

La valoración del patrón de la especie de NF- $\kappa$ B expresada en los órganos linfáticos de los ratones *aly/aly* indicó que, además de intervenir en la regulación del complejo o de los complejos de NF- $\kappa$ B que comprenden las proteínas Rel (A+p50) e I $\kappa$ B, la NIK también participa en el control de la expresión/activación de otras especies de NF- $\kappa$ B. Más notablemente, los linfocitos de *aly/aly* carecen de p52, una especie de NF- $\kappa$ B que se forma específicamente en los linfocitos B maduros a través del procesamiento proteolítico de un precursor inactivo, p100 (NF- $\kappa$ B2), lo que sugiere que no se da la conversión de p100 en p52. (Yamada, T. et al. 2000. *J. Immunol.* 165: 804-12). De hecho, se ha demostrado que NIK participa en la fosforilación de p100 específica de sitio. Ambos conducen directamente a la fosforilación de IKK $\alpha$  que a su vez fosforila a p100. Esta fosforilación sirve de desencadenante molecular de la ubiquitinación y del procesamiento activo de p100 para formar p52. Esta actividad de procesamiento de p100 se encontró que se abolía con la mutación *aly* (Xiao, G. et al. 2001. *Mol. Cell* 7: 401-9; Senftleben, U. et al. 2001. *Science* 293: 1495-9).

En vistas de la homología estructural entre la NIK y las MAP3K, se ha intentado explorar varias veces la implicación de la NIK en las cascadas de ERK, JNK y p38, las otras tres cascadas de proteína-cinasas principales en las que intervienen las MAP3K (Akiba, H. et al., 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 13353-8). Se ha demostrado que NIK interviene en la cascada de ERK en las células de feocromocitoma PC12 (Foehr, E. D. et al. 2000. *J. Biol Chem.* 275: 34021-4). También se han presentado pruebas de que, en algunas células, la NIK puede participar en la señalización para la fosforilación de Jun, la diana cascada abajo de la cascada de JNK, independientemente de esta cascada concreta (Akiba, H. et al., 1998. *J. Biol. Chem.* 273. 13353-8; Natoli, G. et al. 1997. *J Biol Chem.* 272, 26079-82). En conjunto, estos hallazgos indican que NIK realmente sirve de mediador para la activación del NF- $\kappa$ B, pero que también tiene otras funciones, y que ejerce estas funciones de una manera específica del receptor y de la célula.

Al igual que otras MAP3K, la NIK puede activarse como consecuencia de la fosforilación del 'asa de activación' dentro de la molécula de NIK. De hecho, la mutación de un sitio de fosforilación dentro de este asa (Thr559) impide la activación del NF- $\kappa$ B tras la sobreexpresión de NIK (Lin, X. et al. 1999. *Immunity* 10: 271-80). Además, la actividad de NIK parece estar regulada por la capacidad que tienen de unirse entre sí las regiones cadena arriba y cadena abajo de su motivo cinasa (Lin et al. *Molec. Cell Biol.* (18) 10, 5899-5907, 1998). La región del extremo carboxilo de NIK cadena abajo de su parte cinasa se ha demostrado que es capaz de fijarse directamente a IKK $\alpha$  (Regnier, C. H et al. 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. et al., 1997. *Nature* 385: 540-4). Tales interacciones se necesitan aparentemente para el funcionamiento de NIK en la señalización de NF- $\kappa$ B. La región del extremo amino de NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD, por su nombre en inglés), que está compuesto por un motivo básico (BR, por su nombre en inglés) y un motivo repetitivo rico en prolinas (PRR) (Xiao, G. et al. 2001. *Mol. Cell* 7: 401-9). Aparentemente, el NRD del extremo amino interacciona con la región del extremo carboxilo de NIK en *cis*, con lo que inhibe la fijación de NIK a su sustrato (IKK $\alpha$  y p100). La expresión ectópica de NIK parece formar espontáneamente oligómeros en los cuales esta fijación de las regiones del extremo amino al extremo carboxilo en cada molécula de NIK se ven alteradas y muestran un gran nivel de actividad constitutiva (Lin, X. et al. 1999. *Immunity* 10: 271-80). La fijación de la región del extremo carboxilo de NIK a la proteína adaptadora asociada al receptor del TNF TRAF2, así como otras TRAF, (Malinin, N. L. et al., 1997. *Nature* 385: 540-4; Rothe, M. et al., 1994. *Cell* 78: 681-92; Takeuchi, M. et al., 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 19935-42) lo más probable es que participe en la activación de NF- $\kappa$ B gracias a la acción de NIK.

Se han presentado pruebas de que NIK, a través de la fijación de su región del extremo carboxilo a IKK $\alpha$ , puede activar el complejo IKK. Se ha demostrado que es capaz de fosforilar la Ser176 en el asa de activación de IKK $\alpha$  y, por tanto, de activar esta molécula (Ling, L. et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 3792-7). En consonancia con tal modo de acción, los estudios relativos a los mecanismos que explican que LT- $\beta$ R no active el NF- $\kappa$ B en los FER de *aly/aly* han indicado que la mutación de NIK destruye la activación del señalosoma de IKK y la posterior

fosforilación de I $\kappa$ B (Matsushima, A. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193: 631-6). La capacidad que tiene NIK para fijarse a p100 directamente a través de su región del extremo carboxilo y fosforilarla sugiere que p100 sirve de sustrato directo de NIK (Xiao, G. y Sun, S. C., 2000. *J Biol Chem.* 275: 21081-5). Sin embargo, un estudio reciente ha indicado que NIK interviene en la fosforilación de p100 de un modo indirecto, a través de la fosforilación y, por tanto, de la activación de IKK $\alpha$  que a su vez fosforila a p100 (Senftleben, U. et al., 2001, *Science.* 293: 1495-9).

Así pues, la activación de las moléculas de NF- $\kappa$ B mediante NIK representa un punto de control crítico para la regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B.

Tal y como se describe más arriba, la falta de regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B está asociada a la patogenia de distintas enfermedades humanas importantes, tal como numerosas enfermedades malignas y enfermedades asociadas a respuestas inmunitarias patológicas (revisado en Yamamoto y Gaynor, 2001. *J. Clin Invest.* 107: 135-142). Por ejemplo, la activación de la vía de NF- $\kappa$ B está notablemente implicada en la patogenia de la enfermedad inflamatoria crónica, tal 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 enteropatía inflamatoria. Además, la falta de regulación de NF- $\kappa$ B aparece implicada en la patogenia de otras enfermedades, tal como la aterosclerosis (Collins y Cybulsky, 2001. *J. Clin Invest.* 107: 255-64; Leonard, W. J et al. 1995. *Immunol. Rev.* 148: 97-114) y la enfermedad de Alzheimer (Mattson y Camandola, 2001. *J. Clin. Invest.* 107. 247-54; Lin, X. et al., 1999. *Immunity* 10: 271-80) en la cual está al menos parcialmente implicada la respuesta inflamatoria.

Varios conjuntos de resultados indican que la activación de NF- $\kappa$ B sobre los genes de las citocinas es una contribución importante a la patogenia del asma, que se caracteriza por la infiltración de las células inflamatorias y la pérdida de la regulación de muchas citocinas y quimiocinas en el pulmón (Ling, L. et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 3792-7). Las citocinas que activan el NF- $\kappa$ B, tales como el TNF, están elevadas en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide y contribuyen a los cambios inflamatorios crónicos y a la hiperplasia sinovial que se observa en las articulaciones de estos pacientes (Malinin, N. L. et al., 1997. *Nature* 385, 540-4). La administración de anticuerpos dirigidos contra el TNF o de un receptor truncado del TNF que se fija al TNF puede mejorar considerablemente los síntomas de los pacientes con artritis reumatoide.

En la patogenia de las enteropatías inflamatorias, entre ellas la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, también influyen los incrementos de la producción de citocinas proinflamatorias desde los linfocitos y desde los macrófagos (Matsumoto, M. et al., 1999, *J Immunol.* 163. 1584-91). La activación del NF- $\kappa$ B se observa en las muestras de biopsia de la mucosa de los pacientes con la enfermedad de Crohn activa y con colitis ulcerosa. El tratamiento con corticoesteroides a los pacientes que padecen enteropatías inflamatorias disminuye la actividad del NF- $\kappa$ B en las muestras de biopsias y reduce los síntomas clínicos. Estos resultados indican que la estimulación de la vía del NF- $\kappa$ B está implicada en la mejoría de la respuesta inflamatoria asociada a estas enfermedades.

La aterosclerosis está favorecida por muchas agresiones del endotelio y del músculo liso de la pared del vaso dañado (Matsushima et al., 2001). Un gran número de factores del crecimiento, citocinas y quimiocinas liberados desde las células endoteliales, músculo liso, macrófagos y linfocitos están implicados en este proceso fibroproliferativo e inflamatorio crónico (Matsushima, A. et al. 2001. *J Exp Med.* 193, 631-6). Todos coinciden en que la regulación de NF- $\kappa$ B sobre los genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el control de la proliferación celular desempeña una función importante en el inicio y la progresión de la aterosclerosis.

Tal y como se describe más arriba, se ha demostrado que las anomalías de la regulación de la vía del NF- $\kappa$ B están implicadas en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, la inmunorreactividad del NF- $\kappa$ B se encuentra predominantemente dentro y alrededor de los primeros tipos de placas neuríticas de la enfermedad de Alzheimer, mientras que los tipos de placas maduras muestran una reducción considerable de la actividad del NF- $\kappa$ B (Mercurio F. y Manning. A. M., 1999. *Curr. Opin Cell Biol.* 11: 226-32). Así pues, la activación del NF- $\kappa$ B se encuentra en el inicio de las placas neuríticas y de la apoptosis neuronal durante las fases tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, estos datos indican que la activación de la vía del NF- $\kappa$ B es importante en una serie de enfermedades cuyo origen tiene un componente inflamatorio.

Además de intervenir en la patogenia de las enfermedades asociadas a la falta de regulación de las respuestas inmunitarias, la hiperactivación o la activación constitutiva de la vía del NF- $\kappa$ B también interviene en la patogenia de una serie de cánceres humanos. La activación anormalmente alta y/o constitutiva de la vía de NF- $\kappa$ B se da con frecuencia en numerosas neoplasias humanas que incluyen leucemias, linfomas y tumores sólidos (Miyawaki, S. et al., 1994. *Eur. J Immunol.* 24: 429-34). Estas anomalías dan lugar a una cantidad elevada anormal y/o constitutiva del NF- $\kappa$ B en el núcleo de una serie de tumores, entre ellos cáncer de mama, de ovario, de próstata y de colon. La mayor parte de estos cambios probablemente se deben a alteraciones de las proteínas reguladoras que activan las vías de señalización que conducen a la activación de la vía del NF- $\kappa$ B. Sin embargo, las mutaciones que inactivan las proteínas I $\kappa$ B, además de la amplificación y reorganización de los genes que codifican los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B, puede dar lugar a una mejoría de los niveles nucleares de NF- $\kappa$ B observados en algunos tumores (Emmerich et al., *Blood.* 1 de noviembre de 1999; 94 (9): 3129-34).

Ya que, como se describe más arriba, la NIK es decisiva para la activación del NF- $\kappa$ B, una estrategia potencialmente potente para regular la activación del NF- $\kappa$ B, y por tanto para tratar enfermedades asociadas a la falta de regulación

de la actividad del NF- $\kappa$ B, implica la identificación de los anticuerpos capaces de fijarse específicamente a NIK o a una porción específica de la misma y, mediante lo cual, se impide o se inhibe la activación del NF- $\kappa$ B debida a la NIK. Gracias a que se puede detectar específicamente la NIK o una porción específica de la misma, tales anticuerpos además permitirían la caracterización de aspectos de los procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos en los que interviene la NIK o una porción específica de la misma.

Se han propuesto distintas estrategias en la técnica anterior que intentan utilizar anticuerpos para que se fijen específicamente a NIK (véase la tabla 2).

Una estrategia ha intentado utilizar los anticuerpos monoclonales de IgG de ratón para la fijación específica de los restos de aminoácidos 700 a 947 de la región del extremo carboxilo del polipéptido de NIK.

10 Otra estrategia ha intentado emplear anticuerpos policlonales de cabra para la fijación específica de la región del extremo amino de la proteína NIK.

Otra estrategia más ha intentado utilizar anticuerpos policlonales de conejo para fijar específicamente los restos de aminoácidos 700 a 947 o 931 a 947 de la región del extremo carboxilo del polipéptido de NIK.

15 Sin embargo, todas las estrategias mencionadas más arriba tienen desventajas importantes. Los anticuerpos de la técnica anterior no se pueden fijar a NIK, ni a una porción específica de la misma, con una afinidad, especificidad y/o versatilidad óptimas. Por ejemplo, los anticuerpos que se fijan a la NIK de la técnica anterior son incapaces de fijarse específicamente a cualquier porción del dominio cinasa de NIK, ni de fijarse específicamente a varias partes de las regiones del extremo carboxilo y del extremo amino, tales como porciones de las mismas, implicadas en la actividad de NIK. Por tanto, ya que la activación de NF- $\kappa$ B implica fosforilaciones mediadas por NIK, los anticuerpos de la

20 técnica anterior no son adecuados para bloquear o inhibir la actividad cinasa de NIK. Las preparaciones de anticuerpos policlonales de la técnica anterior también tienen el problema adicional de que se han generado contra segmentos de NIK subóptimamente grandes y, por tanto, incluyen anticuerpos específicos para un intervalo subóptimamente amplio de epítomos (por ejemplo, véase la tabla 2, más adelante). Además, los anticuerpos contra la región del extremo amino que no se obtuvieron de ratones en la técnica anterior no pueden unirse

25 específicamente a los ligandos del anticuerpo antirratón que constituyen el tipo de reactivos de marcación secundaria que se emplean más ampliamente en los ensayos de detección con anticuerpos. Propiamente dicho, los anticuerpos contra la región del extremo amino de la técnica anterior son subóptimos para detectar la región del extremo amino de NIK.

30 Así pues, todas las estrategias de la técnica anterior no han conseguido dar a conocer ningún anticuerpo capaz de fijarse a la NIK, o a una porción específica de la misma, con una afinidad, especificidad y/o versatilidad que permite la regulación óptima de la actividad de NIK y, por tanto, de la actividad de NF- $\kappa$ B, y/o que permite la detección óptima de NIK.

Por lo tanto, hay una necesidad ampliamente reconocida de anticuerpos carentes de las limitaciones de anteriores, y sería muy ventajoso tenerlos.

### 35 **Compendio de la invención**

La invención se refiere a un anticuerpo o preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos policlonales y/o fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de los mismos, en donde los anticuerpos se generan contra un péptido que consiste de la SEQ ID n.º 12 del dominio cinasa de NIK.

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

40 En un aspecto de la invención, dicho anticuerpo o preparación de anticuerpos es además capaz de detectar específicamente la NIK o una muteína, derivado funcional, fracción activa, derivado por permutación circular, sal o una porción de la misma, p. ej., mediante análisis de inmunotransferencia, ELISA, inmunoprecipitación y/o capaz de regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK.

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

50 En una realización, la invención se refiere a una preparación que comprende anticuerpos policlonales y/o fragmentos de los mismos que son capaces de fijarse específicamente a la NIK o a una muteína, derivado funcional, fracción activa, derivado por permutación circular o sal de la misma, en donde el anticuerpo se prepara mediante la inmunización de un mamífero con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos, o una porción de dicha secuencia de aminoácidos, presentada en la SEQ ID n.º 7, preferiblemente capaz de detectar y/o inhibir otras especies de NIK tal como la NIK murina.

Una realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal generado por el clon de hibridoma Pep 12-629-62-18 depositado en el CNCM con el n.º I-3095, y los respectivos hibridomas que generan los anticuerpos.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un vehículo

farmacéuticamente aceptable y, como un ingrediente activo, una preparación de anticuerpo o un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Esta especificación también enseña un método para regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK, en donde el método comprende poner en contacto la molécula de NIK con una preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención.

En otra realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un sustrato, p. ej., una matriz de cromatografía de afinidad, un glúcido (p. ej., agarosa, sefarosa y celulosa), perla, una resina, o una superficie plástica, unido covalentemente a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos se presenta en la SEQ ID n.º 12 para capturar selectivamente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente al antígeno diana.

También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de una enfermedad ocasionada o agravada por la actividad de NIK, que comprende la administración de un anticuerpo o preparación de acuerdo con la invención a un individuo que lo necesita.

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

En otra realización más, 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 12-629-62-18 en medio líquido o en el abdomen de un mamífero para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.

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 la SEQ ID n.º 12.

En otra realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para la purificación de una proteína que se fija a NIK, que comprende poner en contacto una muestra que contiene NIK y la proteína que se fija a NIK con el anticuerpo o preparación de anticuerpos de la invención, coimmunoprecipitar la NIK y la proteína que se fija a NIK, lavar el complejo inmunitario producido y recuperar la proteína que se fija a NIK del complejo inmunitario gracias al uso de un péptido competidor procedente de NIK.

También se describe en la presente memoria el uso de una preparación de anticuerpo o un anticuerpo de acuerdo con la invención, para la purificación inmunitaria de NIK o de una muteína, derivado funcional, fracción activa, derivado por permutación circular o sal de la misma.

La invención también se define mediante las reivindicaciones.

### 30 Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en la presente memoria, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos acompañantes. Con la referencia específica ahora en detalle a los dibujos, se hace hincapié en que la información mostrada figura a modo de ejemplo y únicamente con el fin de ilustrar la explicación de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan con el objeto de dar a conocer lo que se cree que es lo más útil y para comprender fácilmente la descripción de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este aspecto, no se hace ningún intento por mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle de lo que es necesario para un conocimiento fundamental de la invención, y la descripción ilustrada con los dibujos hará evidente para los expertos en la técnica la manera en que se pueden llevar a la práctica varias formas de la invención.

En los dibujos:

La figura 1 muestra un diagrama esquemático que describe el polipéptido de NIK, las regiones del mismo y la posición en ella de los péptidos procedentes de NIK utilizados para las inmunizaciones.

La figura 2 muestra un diagrama de secuencia que describe la secuencia de aminoácidos de la NIK humana (SEQ ID n.º 21). Los péptidos procedentes de NIK utilizados para las inmunizaciones están subrayados (nota: los péptidos que se muestran que no tienen un resto Cys en el extremo amino se sintetizaron con un resto Cys adicional en el extremo amino y se utilizaron tal cual para la inmunización).

La figura 3 muestra una fotografía de un análisis de inmunotransferencia Western que describe la capacidad de los sueros de ratones inmunizados con los péptidos indicados procedentes de NIK para detectar la NIK con eficacia en el lisado de proteínas de las células transfectadas con el PCS3MTNIK. El anticuerpo anti-myc-tag se utilizó como control positivo.

Las figuras 4a-d muestran fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que describe la capacidad de los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos indicados procedentes de NIK para detectar la NIK con una sensibilidad muy alta en el lisado de proteínas inmunoprecipitadas con proteína G a partir de las células transfectadas con el PCS3MTNIK. Los análisis mostrados en las figuras 4a-d se realizaron en paralelo, y se utilizó

un anticuerpo anti-myc-tag como control positivo (figura 4d).

La figura 5 muestra un histograma que describe la capacidad que tiene el suero de ratones inmunizados con los péptidos indicados procedentes de NIK para detectar la NIK por ELISA en el lisado de proteínas de las células transfectadas con el pcHis-NIK. Se utilizó un anticuerpo anti-His-tag como control positivo. Las flechas indican la proteína de fusión NIK-myc.

La figura 6 muestra fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que describe la capacidad que tiene el sobrenadante del hibridoma para detectar la NIK en un lisado de proteínas de las células transfectadas con el PCS3MTNIK. Los sobrenadantes del cultivo de tres hibridomas Pep 7-81.1, Pep 11-355.8 y Pep 12-629-62-18 se analizaron por análisis de inmunotransferencia Western para detectar la NIK etiquetada con myc. Las inmunotransferencias se hibridaron con el sobrenadante del cultivo del hibridoma indicado a una dilución de 1:500.

La figura 7 muestra fotografías de un análisis de inmunotransferencia Western que describe la capacidad de los anticuerpos monoclonales Pep 7-81.1, Pep 11-355.8 y Pep 12-629-62-18 para detectar la NIK en el lisado de proteínas inmunoprecipitadas con proteína G a partir de las células transfectadas con el PCS3MTNIK. Inmunoprecipitación: el lisado de 293-T que expresa la proteína NIK etiquetada con myc se utilizó como sustrato para analizar la capacidad de inmunoprecipitación de los anticuerpos monoclonales indicados. Carril 1: anticuerpo Pep7-81 purificado por afinidad desde líquido ascítico. Carril 2: anticuerpo Pep 12-629.62.18. Carril 3: anticuerpo Pep 11 355.8. Carril 4: anticuerpo Pep 7 81.1. Carril 5: anti-myc. Carril 6: anticuerpo Pep 12 629.62.25 de ascitis. Carril 7: control de IgG de ratón.

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

La figura 9 muestra la detección de la NIK de ratón sobreexpresada en las células HeLa con el anticuerpo monoclonal 81 anti-NIK.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

Al llevar la presente invención a la práctica, se generó una preparación de anticuerpo que inesperadamente era capaz de: (i) fijarse específicamente a NIK, o una porción específica de la misma, tal como la región cinasa o una porción específica de la misma, o una porción específica de la región del extremo amino o del extremo carboxilo; o (ii) fijarse específica y óptimamente a NIK, o una porción específica de la misma, tal como la región cinasa o una porción específica de la misma, o una porción específica de la región del extremo amino o del extremo carboxilo. La capacidad de la preparación de anticuerpo de la presente invención para fijarse específicamente a la región de la cinasa completa o a cualquier porción específica de la misma, o fijarse específicamente a cualquiera de las diferentes porciones específicas de las regiones del extremo amino o carboxilo de la NIK es única respecto a todos los anticuerpos de la técnica anterior.

Así pues, en contraste nítido con los anticuerpos de la técnica anterior, la preparación de anticuerpos descrita en la presente memoria se puede utilizar para detectar óptimamente la NIK o una porción específica de la misma. El anticuerpo de la invención también puede utilizarse para coimmunoprecipitar y aislar los factores reguladores que se fijan a la NIK.

El experto en la técnica apreciará que una preparación de anticuerpo tal como la de la presente invención se puede tratar con los métodos estándares, por ejemplo, tal y como se describe a continuación, para generar una preparación de uno o varios tipos de fragmentos de anticuerpo que tienen características de fijación al antígeno esencialmente idénticas a las de la preparación de anticuerpo sin tratar.

Así pues, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se da a conocer una preparación de un anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo capaces de fijarse específicamente a una secuencia de aminoácidos, o a una porción de la misma, en donde la secuencia de aminoácidos se presenta en la SEQ ID n.º 12.

Preferiblemente, la fijación es a la porción del péptido de la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEQ ID n.º 12 o a una porción de la misma. Más preferiblemente, la fijación es a la porción del péptido de la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEQ ID n.º 12.

La terminología «una porción de un péptido» se define como al menos un tripéptido de SEQ ID n.º 22.

La secuencia de aminoácidos presentada en las SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20 o 22, o una porción de tal secuencia de aminoácidos, se denomina de aquí en adelante «antígeno diana».

Tal y como se describe a continuación, la preparación puede utilizarse para regular óptimamente una actividad bioquímica de la cinasa que induce el NF-κB (NIK)/MAP3K14, tal como una actividad cinasa y, por lo tanto, puede utilizarse para regular óptimamente la activación de NF-κB, y mediante lo cual, puede utilizarse para tratar óptimamente un enfermedad asociada con la pérdida de la regulación de la actividad de NF-κB. Además, la preparación puede utilizarse singularmente para detectar la región cinasa de NIK, o alguna de las diferentes

porciones específicas de la misma, y puede utilizarse para detectar óptimamente alguna de las distintas porciones específicas de la región del extremo amino o carboxilo de NIK. Como tal, la preparación se puede utilizar para caracterizar óptimamente aspectos de procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos en los que interviene NIK o porciones específicas de la misma.

- 5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «que trata», cuando se refiere a una enfermedad, se refiere a prevenir la aparición de una enfermedad, aliviar una enfermedad, atenuar o eliminar los síntomas de una enfermedad, enlentecer o revertir la progresión de una enfermedad o curar una enfermedad.

- Según la aplicación y el propósito, la preparación descrita en la presente memoria puede ventajosamente comprender cualquiera de las diferentes combinaciones de poblaciones de anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo, y puede comprender ventajosamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo caracterizado por cualquiera de las diferentes combinaciones de características funcionales y/o estructurales. Por ejemplo, la preparación puede ventajosamente comprender: (i) una población de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo capaces de fijarse específicamente a alguna de las diferentes combinaciones de antígenos diana de la presente invención; (ii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente a alguna de las distintas porciones específicas de la secuencia de aminoácidos presentada en las SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 o 20; y/o (iii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a alguna de las diferentes moléculas detectables.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «anticuerpo» se refiere a una molécula de anticuerpo sustancialmente completa o intacta.

- 20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «fragmento de anticuerpo» se refiere a una molécula que comprende una porción de un anticuerpo capaz de fijarse específicamente a un antígeno, a un determinante antigénico o a un epítipo.

Tal y como se describe en el apartado de los ejemplos, que viene a continuación:

- 25 (i) las secuencias de aminoácidos presentadas en las SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5 o 6 representan los restos de aminoácidos 60-76, 86-99, 135-150, 215-228, 363-378 o 385-398 de la NIK de humano, respectivamente, y se ubican en la región del extremo amino de la NIK humana;
- (ii) la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 22 representa los restos de aminoácidos 401-681 de la NIK de humano que corresponde a la región cinasa de la NIK de humano y el entorno de la región cinasa, y;
- 30 (iii) las SEQ ID n.º 7, 8, 9, 10, 11 o 12 representan los restos de aminoácidos 405-420, 427-441, 509-523, 605-619, 635-650 o 666-681 de la NIK de humano, respectivamente, y se ubica en la región cinasa o cerca de la región cinasa de la NIK de humano; y
- (iv) las SEQ ID n.º 12, 13, 15, 17, 18, 19 o 20 representan los restos de aminoácidos 696-712, 752-767, 836-851, 871-885 o 904-917 de la NIK de humano, respectivamente, y se ubica en la región del extremo carboxilo de la NIK de humano.
- 35

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

Al llevar la presente invención a la práctica, se generaron inesperadamente diferentes preparaciones de anticuerpo con las propiedades siguientes:

- 40 Anticuerpo que tiene la capacidad de fijarse a la «región flanqueante del dominio cinasa de NIK», p. ej., a péptidos de la región del extremo amino del dominio cinasa y preferiblemente a los péptidos 405-420 (SEQ ID n.º 7) y anticuerpos que tienen capacidad de fijarse a péptidos en, o cerca de, la región del extremo carboxilo del dominio cinasa, en particular a los péptidos 635-650 (SEQ ID n.º 11) y 666-681 (SEQ ID n.º 12) o que tienen la capacidad de fijarse a una porción de tales péptidos, son capaces de detectar con eficacia la NIK mediante análisis de inmunotransferencia Western.
- 45 Anticuerpo que tiene la capacidad de fijarse a péptidos de la región de fijación del ATP de la NIK y preferiblemente a los péptidos 427-441 (SEQ ID n.º 8), o que tiene la capacidad de fijarse a una porción de tales péptidos, que son capaces de detectar con eficacia la NIK por ELISA.

- 50 Anticuerpo que tiene la capacidad de fijarse a los péptidos en, o cerca de él, el comienzo de la región del extremo carboxilo, p. ej., entre los restos 635 y 767, en particular a los péptidos 635-650 (SEQ ID n.º 11) y 666-681 (SEQ ID n.º 12), 696-712 (SEQ ID n.º 13) y 752-767 (SEQ ID n.º 15), o que tiene la capacidad de fijarse a una porción de tales péptidos y que es capaz de inmunoprecipitar la NIK con eficacia.

Anticuerpo que tiene la capacidad de fijarse a péptidos en, o cerca de, la región del extremo carboxilo del dominio cinasa, en particular a los péptidos 635-650 (SEQ ID n.º 11) y 666-681 (SEQ ID n.º 12), o que tiene la capacidad de fijarse a una porción de tales péptidos, es capaz de detectar la NIK con eficacia mediante análisis de

inmunotransferencia Western e inmunoprecipitación.

En general, una preparación como la que se describe en la presente memoria, que es capaz de fijarse al antígeno diana con la máxima afinidad, permitirá la disminución óptima de una actividad bioquímica mediada por el antígeno diana, o asociada a él. De igual forma, una preparación de la presente invención capaz de fijarse específicamente al antígeno diana con la máxima afinidad permitirá por lo general la detección del antígeno diana con una sensibilidad óptima.

En virtud de la capacidad descrita más arriba que tiene la preparación para fijarse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, en particular en virtud de la capacidad única que tiene la preparación para fijarse específicamente a un antígeno diana de la presente invención ubicada en una región funcional de NIK, la preparación puede utilizarse para disminuir una actividad bioquímica de NIK. En particular, en virtud de la capacidad única descrita más arriba que tiene la preparación para fijarse específicamente a un antígeno diana de la presente invención ubicado en la región cinasa de NIK, la preparación puede utilizarse para disminuir óptimamente la actividad cinasa de la NIK. Se apreciará que ya que tal actividad cinasa es crucial para la activación del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B, como se describe más arriba, una preparación como la que se describe en la presente memoria, que es capaz de disminuir óptimamente tal actividad cinasa, puede utilizarse para disminuir óptimamente la actividad del NF- $\kappa$ B.

Las proteínas de NF- $\kappa$ B forman una familia de proteínas que comparten un dominio de 300 aminoácidos, el «dominio de homología de Rel». El dominio de homología de Rel interviene en la fijación al ADN, la dimerización y el transporte nuclear de las proteínas NF- $\kappa$ B. Además del dominio de homología de Rel, algunos miembros de la familia de NF- $\kappa$ B también contienen un dominio de transactivación (p. ej., c-Rel, RelB y p65). Los miembros de NF- $\kappa$ B p50 y p52 se producen tras la activación por lisis de los precursores inactivos p105 y p100, respectivamente. P50 y p52c tienen propiedades de dimerización y de fijación al ADN, pero no unos 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 los diferentes componentes del aparato de transcripción contribuyen a los distintos efectos debidos a la activación de la vía de NF- $\kappa$ B. La NIK no afecta a todas las especies de NF- $\kappa$ B, sino solo a determinadas especies de NF- $\kappa$ B, p. ej., induce la degradación de p100 y la generación de p52c, en respuesta a inductores específicos, p. ej., la linfotóxina. La modulación de NIK, p. ej., mediante los anticuerpos de la invención, es por lo tanto probable que afecte a aspectos específicos de las implicaciones patológicas de la activación del NF- $\kappa$ B. Esto es una ventaja, ya que la inhibición inespecífica general de NF- $\kappa$ B es peligrosa, por ejemplo, puede dar lugar a la apoptosis generalizada en el hígado.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «disminuir» cuando se refiere a una actividad bioquímica se refiere a prevenir, reducir o inhibir tal actividad bioquímica.

Cuando se emplea para inhibir una actividad bioquímica de NIK, la preparación debe ser capaz de fijarse específicamente al máximo número de antígenos diana dentro de una porción de NIK asociada a tal actividad bioquímica. En particular, cuando se emplea para inhibir la actividad cinasa de NIK, la preparación debe ser capaz de fijarse específicamente al máximo número de antígenos diana ubicados dentro de la secuencia de aminoácidos de la región cinasa de NIK presentada en la SEQ ID n.º 7. Aunque una preparación como la que se describe en la presente memoria, que es capaz de fijarse específicamente a tan solo un antígeno diana ubicado dentro de una región funcional de NIK, tal como la región cinasa, se puede emplear para inhibir con eficacia una función bioquímica de NIK, tal como una actividad cinasa, asociada a tal región funcional, una preparación capaz de fijarse específicamente al máximo número de antígenos diana ubicados dentro de tal región funcional disminuirá con más eficacia la actividad cinasa gracias a que interfiere con el máximo número de epítomos funcionales dentro de la región funcional.

Alternativamente, para inhibir la actividad cinasa de NIK, la preparación puede ser ventajosamente capaz de fijarse específicamente al máximo número de antígenos diana ubicados dentro de la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12.

En virtud de la capacidad descrita más arriba que tiene la preparación para fijarse específicamente a un antígeno diana de la presente invención, la preparación puede utilizarse para detectar específicamente la NIK con una sensibilidad óptima respecto a los métodos de la técnica anterior, y puede utilizarse singularmente para detectar específicamente la NIK y/o un antígeno diana tal como la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12.

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

Tal y como se describe y se ilustra en el apartado de ejemplos que viene a continuación, una preparación de la presente invención capaz de fijarse específicamente a la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12 se puede utilizar para detectar específicamente, de acuerdo con las orientaciones presentes en ésta, la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12.

Preferiblemente, una preparación de la presente invención capaz de fijarse específicamente a un antígeno diana de

la presente invención procede del suero de animales inmunizados con tal antígeno diana (denominados de aquí en adelante «antisueros»). Tal y como se describe y se ilustra en el apartado de ejemplos que viene a continuación, se puede generar un antisuero de la presente invención capaz de fijar específicamente las secuencias aminoacídicas presentada en las SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 o 20 mediante la inmunización de un mamífero con el antígeno diana de acuerdo con el protocolo presentado en esta invención. A continuación se proporcionan más orientaciones para generar la preparación mediante la inmunización de un mamífero.

A continuación se dan a conocer orientaciones para obtener un polipéptido tal como el antígeno diana.

Una preparación de la presente invención capaz de fijarse específicamente al antígeno diana descrito en la presente memoria puede obtenerse agrupando un conjunto de preparaciones de la presente invención capaces en conjunto de fijarse específicamente al antígeno diana, en donde cada preparación del conjunto procede de sueros de animales inmunizados con el antígeno diana.

Según la aplicación y el propósito, la preparación puede emplearse ventajosamente en la forma de un antisuero sin purificar, o se puede purificar de diferentes maneras antes de su uso. Por ejemplo, la preparación puede utilizarse en forma de un purificado: (i) preparación de un anticuerpo contra un isotipo específico, o conjunto de isotipos; (ii) preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente a una porción específica de la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12; y/o (iii) preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse 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 se puede utilizar conveniente y satisfactoriamente en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, tal y como se describe e ilustra en el apartado de ejemplos que viene a continuación, un antisuero sin purificar de la presente invención, en particular un antisuero sin purificar generado por inmunización con la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 7 u 11, se puede utilizar para detectar con eficacia la NIK mediante análisis de inmunotransferencia Western, y un antisuero sin purificar generado mediante inmunización con la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 8 puede utilizarse para detectar con eficacia la NIK mediante ELISA. En general, para las aplicaciones en las que sea deseable que se beneficien de una preparación de la presente invención capaz de fijarse a un antígeno diana de la presente invención con un margen de afinidades/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 a menudo adecuada para una aplicación determinada, ya que la heterogeneidad de los anticuerpos policlonales o de la mezcla de fragmentos de anticuerpo contenidos en ésta a menudo incluirá uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que tienen una afinidad/especificidad de fijación adecuada por el antígeno diana.

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

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «individuo» se refiere a un humano.

Por ejemplo, una preparación de anticuerpo de IgG de la presente invención se puede purificar ventajosamente de un antisuero de la presente invención mediante la purificación de afinidad con proteína G, preferiblemente por inmunoprecipitación con la proteína G. Tal y como se describe e ilustra en el apartado de ejemplos que viene a continuación, un antisuero de la presente invención procedente de un animal inmunizado con la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 12 y purificado por inmunoprecipitación con la proteína G de acuerdo con el protocolo presentado en ésta, se puede utilizar para detectar con una sensibilidad óptima, mediante análisis de inmunotransferencia Western, la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo purificado tal y como se describe en la presente memoria, que se fija específicamente al antígeno diana, puede ventajosamente utilizarse para regular con especificidad óptima una actividad bioquímica de la NIK asociada al antígeno diana. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención puede utilizarse ventajosamente para detectar el antígeno diana con especificidad óptima. En particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención capaz de fijarse específicamente a un antígeno diana descrito en la presente memoria comprendido dentro de la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12 se puede utilizar ventajosamente para regular la actividad cinasa de la NIK con especificidad óptima. En general, para las aplicaciones que se benefician de una óptima reproducibilidad, estandarización o precisión, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención capaz de fijarse específicamente al antígeno diana será óptimo por lo general con respecto a una preparación sin purificar de la presente invención.

La purificación del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente al antígeno diana se puede conseguir, por ejemplo, mediante la purificación de una preparación de la presente invención, tal como un antisuero sin purificar de la presente invención, por cromatografía de afinidad con un sustrato unido covalentemente al antígeno diana. Tal antígeno diana unido al sustrato se puede utilizar, de acuerdo con la metodología de cromatografía de afinidad estándar, para capturar selectivamente el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo capaz

de fijarse específicamente al antígeno diana.

El sustrato es preferiblemente una matriz de cromatografía de afinidad. Para conseguir una purificación de afinidad óptima se puede emplear ventajosamente una matriz de cromatografía de afinidad, que es un sustrato optimizado para realizar la cromatografía de afinidad.

- 5 Para realizar la purificación se pueden emplear sustratos que tienen distintas características estructurales y químicas.

Preferiblemente, el sustrato comprende un glúcido o un derivado del mismo. Preferiblemente, el glúcido es agarosa, sefarosa o celulosa.

Preferiblemente, el sustrato es una perla, una resina o una superficie plástica.

- 10 Los sustratos tales como perlas, resinas o superficies plásticas que comprenden glúcidos tales como agarosa, sefarosa o celulosa se utilizan sistemáticamente para poner en práctica la cromatografía de afinidad en la técnica.

- 15 En la bibliografía de la técnica se dan a conocer una gran cantidad de orientaciones para poner en práctica la cromatografía de afinidad, tal como la que emplea tales sustratos (por ejemplo, véase: Wilchek M. y Chaiken I., 2000. *Methods Mol. Biol.*, 147: 1-6; Jack G. W. «Immunoaffinity chromatography». *Mol Biotechnol* 1, 59-86; Narayanan S. R., 1994. *Journal of Chromatography A*. 658: 237-258; Nisnevitch M. y Firer M. A., 2001. *J Biochem. Biophys Methods* 49: 467-80; Janson J. C. & Kristiansen T. en: «Packings and Stationary Phases in Chromatography Techniques» (Ed. Unger, K. K.), pág. 747 (Marcel Dekker, Nueva York, 1990); Clonis, Y. D. en: «HPLC of Macromolecules: A Practical Approach», pág 157 (IRL Press, Oxford, 1989); Nilsson J. et al., 1997. *Protein Expr Purif.* 11: 1-16).

- 20 Alternativamente, una preparación de la presente invención se puede purificar con una amplia gama de técnicas estándares de purificación de proteínas, tal como, pero sin limitarse a ellas, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

- 25 Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, que es capaz de fijarse específicamente a un antígeno diana de la presente invención con una afinidad deseada, puede utilizarse ventajosamente para conseguir un nivel deseado de regulación de una actividad bioquímica de la NIK asociada al antígeno diana. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse ventajosamente para detectar el antígeno diana con una sensibilidad deseada. En particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal y como se describe en la presente memoria, que es capaz de fijarse específicamente con la máxima afinidad a un antígeno diana de la presente invención comprendido en la región cinasa de la NIK puede utilizarse  
30 ventajosamente para disminuir óptimamente la actividad cinasa de la NIK. De igual forma, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención capaz de fijarse específicamente al antígeno diana con la máxima afinidad puede utilizarse ventajosamente para detectar el antígeno diana con sensibilidad óptima.

- 35 La purificación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse 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 conseguir, por ejemplo, mediante la purificación por cromatografía de afinidad de un antisuero sin purificar, o más preferiblemente un antisuero purificado con proteína G, de la presente invención, utilizando el antígeno diana como ligando de afinidad, y mediante la elución selectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo fijado al sustrato en condiciones de rigor controlado (por ejemplo, en condiciones de pH controlado y/o concentración de sales). En particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención capaz de fijarse al antígeno  
40 diana con una afinidad máxima se puede obtener convenientemente mediante elución en condiciones de rigor máximo eficaz (por ejemplo, en condiciones de pH máximo o mínimo eficaces y/o concentración de sales máxima). Típicamente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar unido a un antígeno análogo del mismo unido a un sustrato en condiciones de pH y concentración de sales fisiológicos, y tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede eluir típicamente del sustrato al disminuir el pH a 2,5 o más bajo, o al incrementar el pH a 11 o más alto.

- 45 El experto en la técnica apreciará que con las técnicas habituales utilizadas en este campo se puede obtener un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una afinidad caracterizada por una constante de disociación de hasta  $10^{-12}$  para un antígeno análogo.

Tal y como se describe más arriba en la presente memoria, la preparación puede comprender ventajosamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a alguno de los diferentes tipos de moléculas detectables.

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

La preparación puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a cualquiera de los muchos tipos de moléculas detectables, según la aplicación y el propósito.

Por ejemplo, según la aplicación y el propósito, la molécula detectable puede ser ventajosamente un fluoróforo, una enzima, una molécula luminiscente o un radioisótopo.

Preferiblemente, la molécula detectable es una enzima.

5 Una enzima puede utilizarse ventajosamente para permitir la detección del antígeno diana mediante alguno de los diferentes métodos de detección basados en el uso de enzimas. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ensayo inmunoenzimático (ELISA; por ejemplo, para detectar el antígeno diana en una solución), ensayo enzimático de quimioluminiscencia (por ejemplo, para detectar el complejo en una mezcla de proteínas separadas por electroforesis) y ensayo enzimático histoquímico (por ejemplo, para detectar el complejo en un tejido fijado).

10 Tal y como se describe y se ilustra en el apartado de ejemplos que viene a continuación, una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo unido a una enzima puede utilizarse para detectar con eficacia la NIK mediante análisis de inmunotransferencia o ELISA.

Se pueden emplear numerosos tipos de enzimas para detectar el antígeno diana, según la aplicación y el propósito.

15 Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, peroxidasa de rábano picante (HPR, por su nombre en inglés),  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina (AP, por su nombre en inglés).

Ejemplos de moléculas que emiten luz adecuadas incluyen el luminol.

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

20 La molécula detectable puede estar unida al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de varias maneras, según la aplicación y el propósito, y según la naturaleza de las moléculas implicadas. En la bibliografía de la técnica se pueden encontrar muchas orientaciones para unir una molécula detectable a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo [por ejemplo, véase: «Using antibodies: A Laboratory Manual», Ed Harlow, David Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); véase también las directrices exhaustivas dadas a conocer por la American Chemical Society, por ejemplo en: <http://www.chemistry.org/portal/Chemistry>. El experto en la técnica, tal como un químico, poseerá la experiencia requerida para poner en práctica convenientemente tales técnicas de síntesis química.

25 De acuerdo con esto, una preparación de la presente invención que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a una molécula detectable se puede utilizar para detectar de forma eficaz y única el antígeno diana en esencialmente cualquier contexto.

30 La preparación de anticuerpo de la invención se puede utilizar para la inmunopurificación de la NIK o una porción de la misma, preferiblemente anticuerpos de la invención capaces de inmunoprecipitar la NIK con eficacia.

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

Según la aplicación y el fin, la preparación puede ventajosamente ser una preparación de cualquiera de los diferentes tipos de fragmentos de anticuerpo.

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

40 Un fragmento de anticuerpo tiene la ventaja de ser más pequeño que un anticuerpo original del cual procede a la vez que conserva la especificidad de fijación al antígeno diana sustancialmente idéntica, o tanto la especificidad de fijación como la afinidad de fijación, a la del anticuerpo original. Así pues, un fragmento de anticuerpo, en virtud de ser más pequeño que el anticuerpo original, generalmente tendrá por este motivo una biodistribución y unas propiedades de difusión (por ejemplo, sistémicamente *in vivo*, o en tejidos aislados) mejores que el último. Un fragmento de anticuerpo que carece sustancialmente de una región Fc, tal como una Fv de una sola cadena, un Fab', un Fab, un  $F(ab')_2$  o una CDR, es ventajoso para las aplicaciones que implican la exposición de la preparación a una molécula capaz de fijarse específicamente a tal región Fc, y en la cual tal fijación es indeseable. Típicamente esto puede implicar una fijación indeseada de una región Fc expuesta a un receptor de Fc análogo, o a un componente del complemento que se fija a la Fc (por ejemplo, componente C1q del complemento, presente en el suero). Los receptores de Fc se exponen en la superficie de numerosos tipos de células inmunitarias, entre ellas: CPA profesionales, tales como células dendríticas; linfocitos B; y granulocitos tales como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos. Así pues, la ausencia de una región Fc en el fragmento de anticuerpo puede ser particularmente ventajosa para evitar una activación indeseable de las células inmunitarias mediada por el receptor de Fc o una cascada del complemento mediada por el componente del complemento, en particular cuando se administra la preparación *in vivo* a un individuo.

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

Una preparación de F(ab')<sub>2</sub> de la presente invención se puede obtener convenientemente mediante los métodos estándares de la técnica al tratar 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')<sub>2</sub> es una partícula 5S.

5 Un Fab o Fab' es un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción monovalente de fijación a antígeno procedente de un anticuerpo.

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

10 Una preparación de Fab' tal y como se describe en la presente memoria se puede obtener convenientemente mediante los métodos estándares de la técnica al tratar una preparación de anticuerpo de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima pepsina, seguido de la reducción del F(ab')<sub>2</sub> resultante. Tal reducción se puede efectuar con un tiol reductor, y opcionalmente con un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que son resultado de la escisión de los enlaces disulfuro. Tal tratamiento genera dos fragmentos Fab' monovalentes 3,5S y un fragmento Fc.

15 Se puede obtener convenientemente una preparación de Fab con los métodos estándares de la técnica al tratar una preparación de anticuerpo de la presente invención, tal como un antisuero de la presente invención, con la enzima papaína para producir la cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada compuesta por los dominios C<sub>H</sub>1 y variables.

20 Se puede generar la CDR, p. ej., tal y como se describe en la patente europea EP0585939 o tal y como se describe en Strandberg et al. (*Protein Eng.* enero de 2001; 14 (1): 67-74). La CDR descrita en la presente memoria puede ser una CDR modificada, cuyo efecto sobre la modulación de NIK es mejor. Un ejemplo de los métodos de modificación de los péptidos activos se describe en Sawa et al. 1999 (*J. Med. Chem.* 42, 3289-3299).

En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para generar un fragmento de anticuerpo mediante el tratamiento enzimático de un anticuerpo (por ejemplo, véase: Goldenberg. Patente de los EE.UU. n.º 4.036.945 y 4.331.647; Porter R. R. 1999. *Biochem. J.* 73:119-126).

25 Una Fv de una sola cadena (también denominada en la técnica «scFv» por su nombre en inglés) es una molécula monocatenaria que incluye la región variable de la cadena ligera, y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector de polipéptido adecuado.

Se puede obtener una preparación de F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab o Fv de cadena única mediante las técnicas recombinantes.

30 Preferiblemente, la obtención de un fragmento de anticuerpo recombinante se efectúa mediante el aislamiento del ARNm de los linfocitos B de los animales inmunizados con el antígeno diana, la generación de ADNc a partir del ARNm por RT-PCR, y con el uso del ADNc para construir una genoteca de exposición en fagos de fragmentos de anticuerpo. Los linfocitos B se pueden aislar ventajosamente del bazo o, alternativamente, de la sangre, de la médula ósea o de los ganglios linfáticos del animal inmunizado.

35 Los fagos recombinantes que muestran un fragmento de anticuerpo que posee una propiedad de fijación al antígeno diana deseable se pueden seleccionar de la genoteca mediante el enriquecimiento secuencial de los fagos que tienen tal propiedad de fijación entre un gran exceso de clones que no se fijan. Esta selección se puede conseguir con cualquiera de las muchas técnicas que incluyen el escrutinio repetido en un antígeno diana inmovilizado; escrutinio repetido por elución específica; con un antígeno biotinilado; purificación por afinidad en columnas; o escrutinio repetido directo en las células. Tras la selección, se pueden retirar mediante lavado los fagos que muestran fragmentos de anticuerpo inespecíficos, y los fagos fijados, que llevan el scFv que muestra la propiedad deseada de fijación al antígeno diana, se eluyen y luego se amplifican por infección de *E. coli*. Una vez que se ha aislado un fago recombinante que muestra un fragmento de anticuerpo que tiene una propiedad deseada de fijación al antígeno diana, la secuencia polinucleotídica que codifica las regiones variables del fragmento de anticuerpo se pueden recuperar del envase de visualización en fagos y se puede clonar en un vector de expresión procariota o eucariota recombinante con la metodología estándar [por ejemplo, véase: «Current Protocols in Molecular Cloning», Ausubel et al. (eds), Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York, N. Y. (1989); Sambrook et al., véase más abajo y referencias asociadas]. Tal vector de expresión procariota se puede utilizar para producir el fragmento de anticuerpo recombinante purificado en *E. coli* (por ejemplo, véase Studier et al., 1990. *Methods in Enzymol.* 185: 60-89). Tal vector de expresión eucariota se puede utilizar para transformar genéticamente una célula eucariota para expresar el fragmento del anticuerpo recombinante.

55 En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para obtener y explotar una genoteca de exposición en fagos con fragmentos de anticuerpos del ARNm de los linfocitos B [por ejemplo, véase: Hoogenboom et al., 1998. *Immunotechnology* 4: 1-20; Kand et al., 1991. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 88: 4363; Barbas et al. 1991. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 88: 7978; Garrard et al., 1991. *Biotechnology* 9: 1373-1377; Hoogenboom et al., 1991. *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137; Sharon et al., 2000. *Combinational Chemistry and High Throughput Screening* 3: 185-196; patentes de los EE.UU. n.º 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; solicitud de PCT n.º

PCT/GB91/01134; publicaciones de PCT de patente internacional WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401; Brinkman et al., 1995. *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames et al., 1995. *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994. *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958; Persic et al., 1997. *Gene* 187, 9-18; y Burton et al., 1994. *Advances in Immunology* 57: 191-280; Pluckthun en: «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies», vol. 113, Rosenburg y Moors (eds.), Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Hoogenboom et al., 1998. *Immunotechnology* 4: 1-20].

Se apreciará que la metodología descrita más arriba se puede utilizar para obtener una preparación de fragmentos de anticuerpos monoclonales que tiene esencialmente cualquier afinidad y/o especificidad de fijación deseadas al antígeno diana. Tal preparación se puede utilizar en diferentes aplicaciones que se benefician de un reactivo capaz de fijarse al antígeno diana con las características de fijación al antígeno diana definidas.

Ya que la estructura de un Fab' es esencialmente similar a la de un Fab, una preparación que comprende un Fab' se puede emplear esencialmente de forma intercambiable con una que comprende un Fab, en donde tal Fab' y Fab comprenden esencialmente las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. Para las aplicaciones, como será habitualmente el caso, que se benefician de una preparación de la presente invención que comprende un fragmento de anticuerpo capaz de fijarse al antígeno diana con la máxima afinidad, una preparación de F(ab')<sub>2</sub> de la presente invención puede ser mejor que una preparación de Fab, Fab' o scFv debido a la fijación divalente de un F(ab')<sub>2</sub> al antígeno diana respecto a la fijación monovalente de tal fragmento de anticuerpo monovalente.

Como se menciona en la presente memoria más arriba, según la aplicación y el fin, la preparación del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo puede originarse de cualquiera de las diferentes especies de mamíferos.

Una preparación de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo de la presente invención que procede de una especie deseada puede obtenerse del suero del animal de tal especie inmunizado con el antígeno diana.

Tal anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o polivalente, puede tener o no una actividad de interconexión. Los anticuerpos utilizados de acuerdo con la presente invención pueden ser policlonales, tal como los anticuerpos producidos en los conejos, o anticuerpos monoclonales.

Preferiblemente, la invención se refiere al uso de una preparación de anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo procede de ratón.

La terminología «anticuerpo monoclonal» (Acm) quiere incluir los anticuerpos monoclonales, quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos contra anticuerpos antiidiotípicos (anticuerpos anti-anti-Id) que se pueden marcar en forma soluble o fijada, así como fragmentos de los mismos proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero sin limitarse a ellas, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o las técnicas recombinantes.

Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos contra antígenos, cuya población contiene sitios de fijación a epítomos sustancialmente similares. Los Acm se pueden obtener mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); patente de los EE.UU. n.º 4.376.110; Ausubel et al., eds, Harlow y Lane «Antibodies: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., eds, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience N. Y., (1992-1996). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, entre ellas IgG, IgM.

Se dice que un anticuerpo monoclonal es «capaz de fijarse» a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula de modo que fija a la molécula al anticuerpo. La terminología «epítomo» se refiere a la porción de cualquier molécula capaz de ser fijada por un anticuerpo, que también puede ser reconocida por ese anticuerpo. Los epítomos o «determinantes antigénicos» suelen consistir en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como los aminoácidos o las cadenas laterales de glúcidos y tienen características tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

Un «antígeno» es una molécula o una porción de una molécula capaz de ser fijada por un anticuerpo, cuyo antígeno es adicionalmente capaz de inducir en un animal la producción de un anticuerpo capaz de fijarse a un epítomo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítomo. La reacción específica citada más arriba indica que el antígeno reaccionará, de una manera muy selectiva, con un epítomo en su correspondiente anticuerpo y no con otros muchos anticuerpos que pueden estar provocados por otros antígenos.

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados al sitio de fijación al antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo idiopático mediante la inmunización de un animal de la misma especie y del mismo tipo genético (p. ej., cepa de ratón) como fuente del Acm para el cual se quiere preparar el anti-id.

El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo con el que se le inmuniza mediante la producción de un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id).

Véase, por ejemplo, patente de los EE.UU. n.º 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id también puede utilizarse como un «inmunógeno» para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal distinto, lo que produce el llamado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al Acm original, que indujo el anti-Id. Así pues, se pueden identificar otros clones que expresan anticuerpos de la misma especificidad gracias al uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un Acm.

De acuerdo con lo anterior, los Acm generados contra los fragmentos de NIK se pueden utilizar para inducir anticuerpos anti-Id en los animales adecuados, tal como los ratones BALB/c. Los esplenocitos de tales ratones inmunizados se utilizan para producir hibridomas anti-Id que secretan Acm anti-Id. Además, los Acm anti-Id se pueden conjugar a un vehículo tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH, por su nombre en inglés) y utilizarse para inmunizar más ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contendrán anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de fijación del Acm original específico a un epítipo o fragmento de la NIK.

Así pues, los Acm anti-Id tienen sus propios epítipos idiotípicos, o «idiotipos» que son iguales desde el punto de vista estructural al epítipo que se evalúa.

Una preparación tal y como se describe en la presente memoria de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de humano o humanizado también se puede utilizar para aplicaciones que implican la administración de la preparación a un individuo. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de humano o humanizado tenderá por lo general a tener una tolerancia inmunitaria óptima, y por lo tanto, mostrará una semivida óptima *in vivo* en un humano, y por tanto, mostrará una eficacia óptima. A continuación, en la presente memoria, se dan a conocer más orientaciones relacionadas con la producción y explotación de los anticuerpos de humano o humanizados.

Los anticuerpos, entre ellos los fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención se pueden utilizar para detectar cuantitativa o cualitativamente la NIK o una muteína, derivado funcional, fracción activa, derivado por permutación circular, sal o una porción de la misma, en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan la NIK o una muteína, derivado funcional, fracción activa, derivado por permutación circular, sal o porciones de la misma. Esto se puede llevar a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado con fluorescencia conjugada con microscopia de fluorescencia, citometría de flujo o detección fluorimétrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención se pueden emplear histológicamente, como en la inmunofluorescencia o en la microscopia inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de la NIK o de porciones de la misma de la presente invención. La detección *in situ* se puede llevar a cabo retirando una muestra histológica de un paciente, y echando el anticuerpo marcado de la presente invención a tal muestra. El anticuerpo (o fragmento) se echa preferiblemente aplicando el anticuerpo (o fragmento) marcado a una muestra biológica o cubriéndola con él. Mediante el uso de tal procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de la NIK o porciones de la misma, sino también su distribución en el tejido examinado. Gracias al uso de la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que para conseguir la detección *in situ* se puede modificar cualquiera de una amplia gama de métodos histológicos (tal como los procedimientos de tinción).

La muestra biológica puede estar unida a un soporte de fase sólida o vehículo tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido o vehículo que es capaz de inmovilizar las células, partículas celulares o proteínas solubles. A continuación, el soporte o vehículo se puede lavar con los tampones adecuados y luego se trata con un anticuerpo marcado de acuerdo con la presente invención, como se señala más arriba. El soporte o vehículo de fase sólida se puede lavar entonces con el tampón una segunda vez para retirar el anticuerpo sin fijar. La cantidad de marcador fijado en dicho soporte sólido o vehículo puede entonces detectarse mediante medios convencionales.

Con «soporte en fase sólida», «vehículo de fase sólida», «soporte sólido», «vehículo sólido», «soporte» o «vehículo» se hace referencia a cualquier soporte o vehículo capaz de que el antígeno o los anticuerpos se fijen a él. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede tener cierta solubilidad o ser insoluble para los propósitos de la presente invención. El material del soporte puede tener cualquier configuración estructural posible siempre y cuando la molécula conjugada sea capaz de fijarse a un antígeno o a un anticuerpo. Así pues, la configuración del soporte o vehículo puede ser esférica, como en una perla, cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie exterior de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, tal como una hoja, tira de ensayo, etc. Los soportes o vehículos preferidos incluyen las perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para la fijación de anticuerpos o antígenos, o serán capaces de averiguar lo mismo mediante el uso de la experimentación convencional.

La actividad de fijación de un lote de anticuerpos determinado de la invención tal y como se observó más arriba, se puede determinar de acuerdo con los métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo óptimas y operativas para cada determinación mediante el empleo de la experimentación convencional.

Otras etapas, tales como lavar, remover, agitar, filtrar y similares, se pueden añadir a los ensayos como sea habitual

o necesario en cada situación particular.

Uno de los modos por el que se puede marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es mediante la unión del mismo a una enzima y utilizarlo en un inmunoensayo enzimático (EIA, por su nombre en inglés). Esta enzima, a su vez, cuando se expone más tarde a un sustrato adecuado, reaccionará con el sustrato de tal manera que produce un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que se pueden utilizar para marcar el anticuerpo de forma detectable incluyen, pero sin limitarse a ellas, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica,  $\Delta$ -5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura,  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparraginasa, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa. La detección se puede llevar a cabo mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromógeno para la enzima. La detección se puede llevar a cabo también mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con un patrón preparado de forma similar.

La detección se puede llevar a cabo con cualquiera de una serie de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, por marcación radiactiva de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo es posible detectar la R-PTPasa a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA, por su nombre en inglés). Una buena descripción del RIA se puede encontrar en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, de Work, T. S. et al., North Holland Publishing Company, N. Y. (1978) con referencia particular al capítulo titulado «An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques» de Chard, T. El isótopo radiactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador Geiger o un contador de centelleo o por autorradiografía.

También se puede marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado con fluorescencia se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, entonces se puede detectar su presencia gracias a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcación fluorescente utilizados más habitualmente están el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también se puede marcar para detección con metales emisores de fluorescencia tales como  $^{152}\text{E}$  u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo con grupos quelantes de metal, tales como el ácido dietilentriamina-pentaacético (ETPA).

El anticuerpo también se puede marcar de forma detectable al conjugarle un compuesto quimioluminiscente. Luego, la presencia del anticuerpo etiquetado con quimioluminiscencia se determina por detección de la presencia de la luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcación quimioluminiscente 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 halla en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina mediante la detección de la presencia de la luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para los propósitos de marcación son luciferina, luciferasa y ecurina.

Una preparación de anticuerpo de la presente invención se puede adaptar para la utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo «de dos sitios» o «de tipo sándwich». En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad del anticuerpo sin marcar (o fragmento de anticuerpo) se fija a un soporte o vehículo sólido y se le añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado de forma detectable para permitir la detección y/o cuantificación del complejo terciario 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 fijado a la fase sólida se pone en contacto primero con la muestra que se ensaya para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo binario antígeno-anticuerpo en fase sólida. Tras un periodo de incubación adecuado, el soporte o vehículo sólido se lava para retirar el resto de la muestra líquida, que incluye el antígeno sin reaccionar, si lo hay, y luego se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como una «molécula indicadora»). Después de un segundo periodo de incubación para permitir al anticuerpo marcado formar un complejo con el antígeno fijado al soporte o vehículo sólido a través del anticuerpo sin marcar, el soporte o vehículo sólido se lava una segunda vez para retirar el anticuerpo marcado que no reaccionó.

En otro tipo de ensayo «de tipo sándwich», que puede ser útil con los antígenos descritos en la presente invención, se utilizan los llamados ensayos «simultáneos» e «inversos». Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación a medida que el anticuerpo fijado al soporte o vehículo sólido y el anticuerpo marcado se añaden al mismo tiempo a la muestra que hay que analizar. Una vez que se ha completado la incubación, el soporte o vehículo sólido se lava para retirar el residuo de la muestra líquida y el anticuerpo marcado que no forma complejos. A

continuación, se determina la presencia del anticuerpo marcado asociado al soporte o vehículo sólido, igual que ocurriría en un ensayo de tipo sándwich «directo».

- 5 En el ensayo «inverso», se utiliza primero la adición escalonada de una solución de anticuerpo marcado a la muestra líquida seguido de la adición del anticuerpo sin marcar fijado a un soporte o vehículo sólido tras un periodo de incubación adecuado. Tras una segunda incubación, se lava la fase sólida de una manera convencional para liberarlo del residuo de la muestra a analizar y la solución del anticuerpo marcado que no reacciona. A continuación se determina el anticuerpo marcado asociado a un soporte o vehículo sólido como en los ensayos «simultáneo» y «directo».

- 10 La preparación se puede utilizar por sí misma o se puede formular como un ingrediente activo en una composición farmacéutica.

Así pues, tal y como se describe en la presente memoria, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención.

- 15 Los métodos para formular el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención como un ingrediente activo en una composición farmacéutica, y los métodos para explotar tal composición farmacéutica se describen a continuación.

Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, en virtud de su capacidad para fijarse específicamente a una región, tal como una región funcional, de NIK, el anticuerpo o fragmento anticuerpo de la presente invención se puede utilizar para regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK asociada con tal región funcional.

- 20 Así pues, de acuerdo con otro aspecto más de esta especificación, se da a conocer un método para regular una actividad bioquímica de una molécula de NIK. El método se lleva a cabo al poner en contacto la molécula de NIK con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en la presente memoria.

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

- 25 También se describe en la presente memoria el uso de una preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de fijarse específicamente a una secuencia aminoacídica, o a una porción de dicha secuencia aminoacídica, en donde dicha secuencia aminoacídica se presenta en las SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 18, 19, 20 y/o 22 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad ocasionada o agravada por la actividad de NIK.

- 30 Otro aspecto de esta especificación se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad ocasionada o agravada por la actividad de NIK que comprende la administración de una preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de fijarse específicamente a una secuencia aminoacídica, o a una porción de dicha secuencia aminoacídica, en donde dicha secuencia aminoacídica se presenta en la SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 18, 19, 20 y/o 22 a un individuo que lo necesita.

- 35 Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, ya que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención es capaz de fijarse específicamente a la región cinasa de NIK de tal manera para que disminuye la actividad cinasa de NIK, y ya que tal actividad se necesita para la activación del NF-κB, como se elabora con detalle en el apartado «Campo y antecedentes de la invención» de más arriba, el método puede utilizarse para disminuir óptimamente la actividad del NF-κB.

- 40 Por lo tanto, gracias a que permite la disminución óptima de la actividad del NF-κB, el método puede utilizarse para tratar óptimamente, en un individuo, una enfermedad asociada a la falta de regulación de la actividad de NF-κB, en particular, la actividad excesiva o constitutiva de NF-κB.

Al utilizar el método de acuerdo con este aspecto descrito en la presente memoria para tratar la enfermedad en el individuo, el poner en contacto la molécula de NIK con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede llevar a cabo ventajosamente mediante la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un individuo.

- 45 En particular, la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede llevar a cabo mediante la administración de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en la presente memoria como ingrediente activo.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede administrar para conseguir una concentración suficiente de fragmento de anticuerpo fijado al antígeno diana para conseguir una regulación deseada de la actividad bioquímica.

- 50 También se da a conocer un método para preparar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención. El método comprende hacer crecer el clon de hibridoma Pep 12-629-62-18 en medio líquido o abdomen de mamífero para permitir que se produzca el hibridoma y se acumule el anticuerpo monoclonal.

Ejemplo de hibridoma a utilizar para la preparación de los anticuerpos monoclonales es el clon de hibridoma Pep 12-

629-62-18 depositado en el CNCM con el número I-3094.

El experto en la técnica, tal como un médico, en particular un médico especializado en la enfermedad, poseerá la experiencia requerida para determinar un protocolo terapéutico adecuado, que incluye una vía de administración adecuada, y una dosis adecuada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tratar con eficacia la enfermedad de acuerdo con la enseñanzas de la presente especificación.

NIK suele ser una molécula intracelular y, como tal, para que entre en contacto de forma óptima el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con la molécula de NIK en una célula, tal como una célula caracterizada por la falta de regulación de la actividad de NF- $\kappa$ B, el método se debería practicar de tal modo que facilite el contacto del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo con la molécula de NIK dentro de la célula.

10 Tal contacto intracelular podría facilitarse de varias maneras, según la aplicación y el fin.

Por ejemplo, tal contacto intracelular se podría llevar a cabo al poner en contacto la célula con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en asociación con un vehículo de naturaleza lipídica capaz de facilitar la penetración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo al interior de la célula.

15 Alternativamente, tal contacto intracelular se puede llevar a cabo mediante la transformación genética de la célula con un vector de expresión capaz de expresar dentro de la célula el fragmento de anticuerpo de la presente invención.

Los tipos adecuados de vehículos lipídicos que facilitan la entrada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo al interior de la célula incluyen liposomas e inmunoliposomas. Los inmunoliposomas, gracias a que permiten la administración específica del tipo celular de las moléculas puede emplearse ventajosamente para administrar selectivamente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo al interior de las células afectadas por la enfermedad, en donde tales células expresan antígenos de superficie distintivos, tales como marcadores de inflamación en las células que muestran una respuesta inmunitaria patológica (por ejemplo, CD25 o CD69 en los linfocitos T activados) o los antígenos asociados a tumores en las células malignas (por ejemplo, HER-2 en las células del adenocarcinoma, MAG-E-1 en las células de melanoma y similares).

25 En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para utilizar tales vehículos de naturaleza lipídica para la introducción intracelular de las moléculas terapéuticas, tales como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención, en las células enfermas (por ejemplo, véase Abra R. M. et al., 2002. *J Liposome Res* 12: 1-3; Park J. W., 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. et al., 1999. *Ann N Y Acad Sci.* 886-293-6; Margalit R., 1995. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 12: 2333-61; Storm G. y Crommelin D. J., 1997. *Hybridoma* 16: 119-25; Park J. W. et al., 1997. *Adv Pharmacol.* 40: 399-435).

La producción intracelular de un fragmento de anticuerpo recombinante, tal como el fragmento de anticuerpo recombinante descrito en la presente memoria, se lleva a la práctica sin más trámite en la técnica. Un fragmento de anticuerpo recombinante expresado intracelularmente se puede denominar un «intracuerpo» en la técnica. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para utilizar la expresión intracelular de un fragmento de anticuerpo recombinante capaz de fijarse específicamente a una biomolécula para regular una actividad bioquímica, tal como una actividad enzimática, de la biomolécula en una célula (por ejemplo, véase: Mhashilkar A. M. et al., 2002. *Gene Ther.* 9: 307-19; Arafat W. et al., 2000. *Cancer Gene Ther.* 7: 1250-6; Cohen P. A. et al., 1998. *Oncogene* 17: 2445-56; Hassanzadeh Gh. G. et al., 1998. *FEBS Lett.* 437: 81-6; Richardson J. H. et al., 1998. *Gene Ther.* 5: 635-44; para orientaciones generales sobre la expresión de un fragmento de anticuerpo recombinante en una célula, véase, por ejemplo: der Maur A. A. et al., 2002. *J Biol Chem.* 277: 45075-85; Zhu Q. et al., 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).

La transformación genética de una célula de mamífero con un vector de expresión se puede llevar a cabo con cualquiera de los distintos métodos de la técnica que se llevan a la práctica habitualmente, tal como transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores víricos recombinantes. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para poner en práctica tales métodos [por ejemplo, véase: Sambrook et al., véase más adelante y las referencias asociadas; Chang et al. en: «Somatic Gene Therapy», CRC Press, Ann Arbor, MI (1995); Vega et al. en: «Gene Targeting», CRC Press, Ann Arbor MI. (1995); *Vectors, A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston MA (1988); Gilboa et al., 1986. *Biotechniques* 4: 504-512; para vectores del sistema nervioso central, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.866.042; para métodos de selección positiva y negativa que inducen la recombinación homóloga, véanse, por ejemplo: patentes de los Estados Unidos n.º 5.464.764 y n.º 5.487.992].

En la presente memoria, más adelante, se dan a conocer más orientaciones relacionadas con la producción y explotación de los vectores de expresión para expresar un fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula.

Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, el método de acuerdo con este aspecto que se describe

en la presente memoria se puede utilizar para tratar óptimamente una enfermedad asociada a la falta de regulación de la actividad del NF- $\kappa$ B. La actividad de NF- $\kappa$ B suele participar en la activación de un muy amplio abanico de respuestas inmunitarias, entre ellas las desencadenadas por: receptores de los antígenos de los linfocitos, receptores coestimuladores de los linfocitos, receptores de TNF, receptores de interleucinas, LMP1, RANK, receptor de tipo Toll humano y lipopolisacárido (LPS). Ya que tales receptores intervienen en un muy amplio abanico de tipos de respuestas inmunitarias, el método de acuerdo con este aspecto de esta especificación se puede utilizar para tratar numerosas enfermedades cuya patogenia está asociada a tales respuestas inmunitarias. Tales enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades relacionadas con los trasplantes y enfermedades alérgicas. Por ejemplo, se ha demostrado que el NF- $\kappa$ B interviene en la patogenia de diferentes ejemplos de tales enfermedades, que incluyen enfermedades alérgicas tales como el asma, enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria tal como la enteropatía inflamatoria, aterosclerosis y enfermedad del Alzheimer, y enfermedades relacionadas con trasplantes tal como el rechazo al injerto. Además, se ha demostrado que la falta de regulación de la señalización del NF- $\kappa$ B está asociada a diferentes enfermedades malignas.

15 Como tal, el método de acuerdo con este aspecto descrito en la presente memoria se puede utilizar para tratar con eficacia las enfermedades tales como las enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, relacionadas con trasplantes, alérgicas y malignas.

Ejemplos específicos de enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con este aspecto de esta especificación se recogen a continuación.

20 Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, el antígeno diana, que es un polipéptido, se puede obtener de distintas maneras.

Preferiblemente, el antígeno diana se obtiene mediante la metodología estándar de síntesis química.

Alternativamente, el antígeno diana puede obtenerse por escisión proteolítica de la NIK expresada de forma natural, o se puede obtener mediante técnicas recombinantes estándares que usan sistemas de expresión *in vitro* (por ejemplo, véase Sambrook et al., más adelante, y las referencias asociadas).

El antígeno diana se puede sintetizar químicamente utilizando, por ejemplo, las técnicas estándares de fase sólida. Tales técnicas incluyen la síntesis exclusiva en fase sólida, los métodos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución. Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida se conocen bien en la técnica [por ejemplo, véase Stewart et al., en «Solid Phase Peptide Synthesis», 2.<sup>a</sup> ed., Pierce Chemical Company, (1984)].

Un polipéptido sintético se puede purificar mediante un procedimiento de cromatografía líquida de gran resolución, tal como se describe en Creighton T. [*Proteins, structures and molecular principles*, W. H. Freeman and Co. N. Y. (1983)] y su secuencia aminoacídica se puede confirmar mediante los procedimientos estándares de secuenciación de aminoácidos.

35 Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, la preparación se obtiene preferiblemente por inmunización de un mamífero con el antígeno diana.

La generación de la preparación *in vivo* puede llevarse a cabo ventajosamente mediante la inyección repetida del antígeno diana en un mamífero en presencia de adyuvantes de acuerdo a una posología que estimula la producción de anticuerpos en el suero. En los casos en los que el antígeno diana es demasiado pequeño para desencadenar una respuesta inmunógena adecuada (denominado «hapteno» en la técnica), el hapteno se puede conjugar a un vehículo neutro desde el punto de vista antigénico, tal como los vehículos de hemocianina de lapa californiana (KLH) o de seroalbúmina [p. ej., seroalbúmina bovina (SAB)] (por ejemplo, véanse las patentes de los EE.UU. n.º 5.189.178 y 5.239.078). La conjugación de un hapteno a un vehículo se puede llevar a cabo con distintos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar la conjugación directa a grupos amino y opcionalmente seguido por la reducción del enlace imino que se forma. Alternativamente, el vehículo se puede conjugar mediante agentes de condensación tales como dicitohexil-carbodiimida u otros agentes de deshidratación carbodiimídicos. Los compuestos conectores también se pueden utilizar para llevar a cabo la conjugación; tanto los conectores homobifuncionales como los heterobifuncionales están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. El complejo inmunógeno resultante se puede inyectar entonces en sujetos mamíferos adecuados tales como ratones, conejos y similares. Tras la generación *in vivo* de un anticuerpo, su título sérico en el mamífero hospedador puede medirse fácilmente con procedimientos de inmunoensayo que se conocen bien en la técnica.

Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, la preparación puede comprender ventajosamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado.

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

1986); Kudo et al., solicitud de patente europea 184187 (publicada el 11 de junio de 1986); Robinson et al., solicitud de patente internacional n.º WO 8702671 (publicada el 7 de mayo de 1987); Riechmann et al. y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, véase más arriba.

Los «anticuerpos de humano» son moléculas que contienen tanto la región constante como la variable de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente adecuados para el uso terapéutico, ya que la inmunogenia antiidiotípica se debería reducir significativamente o, idealmente, estar ausente. Un método para la preparación de anticuerpos completamente humanos consiste en la «humanización» del sistema inmunitario humoral del ratón, a saber, la producción de cepas de ratón capaces de producir Ig humana (Xenomice), mediante la introducción del locus de la inmunoglobulina (Ig) humana en los ratones en los cuales se han inactivado los genes de Ig endógena. Los locus de la Ig son tremendamente complejos en términos de su estructura física y de la reorganización génica y de los procesos de expresión requeridos para finalmente producir una respuesta inmunitaria amplia. La diversidad de los anticuerpos se generan principalmente mediante la reorganización combinatoria entre los diferentes genes V, D y J presentes en los locus de la Ig. Estos locus también contienen los elementos reguladores interpuestos, que controlan la expresión de los anticuerpos, la exclusión alélica, el cambio de clase y la maduración de la afinidad. La introducción de los transgenes de Ig humana sin reorganizar en los ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación de los ratones es compatible con los genes humanos. Además, los hibridomas que secretan los Acm humanos específicos del antígeno de varios isotipos se pueden obtener mediante la inmunización de Xenomice con el antígeno.

Los anticuerpos completamente humanos y los métodos para su producción se conocen en la técnica (Mendez et al. (1997); Buggmann et al. (1991); Tomizuka et al., (2000), patente internacional WO 98/24893).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «muteínas» se refiere a análogos de NIK, en los cuales uno o más de los restos de aminoácidos de los componentes de NIK que se producen de forma natural se reemplazan por diferentes restos de aminoácidos, o se eliminan, o se añaden uno o más restos de aminoácido a la secuencia original de la NIK, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la NIK original. Por lo tanto, estas muteínas se preparan mediante la síntesis conocida y/o mediante las técnicas de mutagénesis específica de sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada.

Las muteínas de acuerdo con la presente especificación incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida al ADN o al ARN, que codifica una NIK, de acuerdo con la presente especificación en condiciones rigurosas. La terminología «condiciones rigurosas» se refiere a la hibridación y las posteriores condiciones de lavado, que los expertos en la técnica denominan convencionalmente «rigurosas». Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, más arriba, Interscience, N. Y., §§6,3 y 6,4 (1987, 1992) y Sambrook et al. (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado de 12-20 °C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada para el híbrido en estudio en, p. ej., SSC 2X y 0,5% de SDS durante 5 minutos, SSC 2X y 0,1% de SDS durante 15 minutos; SSC 0,1X y 0,5% de SDS a 37 °C durante 30-60 min y a continuación, a SSC 0,1X y 0,5% de SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica saben que las condiciones de rigor también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas oligonucleotídicas (tal como 10-40 bases) o de las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar el cloruro de tetrametilamonio (TMAC, por su nombre en inglés) en vez de SSC. Véase Ausubel, más arriba.

Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de NIK, de tal manera que tiene una actividad de NIK sustancialmente similar, o incluso mejor.

En una realización preferida, cualquiera de tales muteínas tiene una identidad u homología de al menos el 40% con la secuencia aminoacídica de la NIK. Más preferiblemente, tiene una identidad u homología de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o lo más preferiblemente al menos el 90%, con ésta.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinadas 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 de las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan.

Para las secuencias en las cuales no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un «porcentaje de identidad». En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la introducción de «huecos» en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineamiento. Se puede determinar un porcentaje de identidad sobre toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (el denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma longitud o de una longitud muy parecida, o sobre longitudes definidas más cortas (el denominado alineamiento local), es decir, más adecuado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias se conocen bien en la técnica. Así pues, por ejemplo, los programas disponibles en el paquete de análisis de secuencias de la Universidad de

Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J. et al., 1984, *Nucleic Acids Res.*, 11 de enero de 1984; 12 (1 Pt 1): 387-95), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, se pueden utilizar para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de «homología local» de Smith y Waterman (*J Theor Biol.* 21 de julio de 1981; 91 (2): 379-80 y *J Mol Biol.* 25 de marzo de 1981; 147 (1): 195-7, 1981) y encuentra la mejor región aislada de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S. F. et al., 1990, *J Mol Biol.* 5 de octubre de 1990; 215 (3): 403-10, *Proc Natl Acad Sci USA.* Julio de 1990; 87 (14): 5509-13, Altschul S. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 1997; 25 (17): 3389-402, accesible a través de la página principal del NCBI en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y FASTA (Pearson W. R., *Methods Enzymol.* 1990; 183: 63-98. Pearson *J. Mol Biol.* 13 de febrero de 1998; 276 (1): 71-84).

Por lo tanto, las muteínas de NIK, que se pueden utilizar como se describe en la presente memoria, o los ácidos nucleicos que la codifican, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución, que el experto en la técnica puede obtener sistemáticamente, sin experimentación innecesaria, basándose en las enseñanzas y las orientaciones presentadas en la presente memoria.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente especificación son lo que se conoce como sustituciones «conservativas». Las sustituciones conservativas de aminoácidos de NIK pueden incluir dentro de un grupo los aminoácidos sinónimos que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente parecidas, de modo que la sustitución entre los miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula. Está claro que las inserciones y deleciones de los aminoácidos también se pueden hacer en las secuencias definidas más arriba sin alterar su función, en particular si las inserciones o deleciones abarcan únicamente unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan ni desplazan los aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, p. ej., los restos de cisteína.

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 lo más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla C.

TABLA A

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

TABLA B

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

TABLA C

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Ejemplos de la producción de sustituciones de aminoácidos en las proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de NIK, para el uso tal y como se describe en la presente memoria, incluyen las etapas de cualquier método conocido, tal como se presentan en las patentes de los EE.UU. n.º 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, a Mark et al.; n.º 5.116.943 a Kohs et al.; n.º 4.965.195 a Namen et al.; n.º 4.879.111 a Chong et al.; y n.º 5.017.691 a Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de los EE.UU. n.º 4.904.584 (Shaw et al.).

Los «derivados funcionales» tal y como se utilizan en la presente memoria cubren derivados de NIK, y sus muteínas, que se pueden preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los restos o que son adiciones a los grupos del extremo amino o carboxilo, mediante los medios conocidos en la técnica.

Una «fracción activa» de acuerdo con la presente especificación puede, p. ej., ser un fragmento de NIK. La terminología «fragmento» se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada. Se pueden preparar fragmentos con facilidad mediante la eliminación de aminoácidos de cualquier extremo de la molécula de NIK y el análisis de la actividad del fragmento resultante. Se conocen proteasas que eliminan los aminoácidos de uno en uno bien desde el extremo amino o bien desde el extremo carboxilo de un polipéptido, y de esta forma se determinan los fragmentos que conservan la actividad

biológica deseada, sólo con la experimentación convencional.

Como fracciones activas de NIK, muteínas y proteínas de fusión de la misma, la presente especificación cubre además cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de la proteína sola o junto a moléculas asociadas o restos unidos a ésta, p. ej., restos de azúcar o de fosfato, o agregados de la molécula de la proteína o los restos de azúcares por sí mismos, siempre y cuando dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a NIK.

La terminología «sales» en la presente memoria se refiere tanto a las sales de grupos carboxilo como a las sales por adición de ácido de grupos amino de la molécula de NIK o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar mediante los medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, de calcio, de amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tal como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por 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 tales sales deben conservar la actividad biológica de NIK.

La terminología «con permutación circular», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula lineal en la que se han juntado los extremos, bien directamente o bien a través de un conector, para producir una molécula circular y, a continuación, la molécula circular se abre en otra posición para producir una nueva molécula lineal cuyos extremos son diferentes de los extremos de la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen las moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha circularizado y luego abierto. Así pues, una molécula con permutación circular se puede sintetizar *de novo* como una molécula lineal y nunca sufrir una etapa de circularización y apertura. La permutación circular concreta de una molécula se designa mediante corchetes que contienen los restos de aminoácidos entre los cuales se elimina el enlace peptídico. Las moléculas con permutación circular, que pueden incluir ADN, ARN y proteína, son moléculas de una sola cadena, que tienen su extremos normales fusionados, a menudo con un conector, y contienen nuevos extremos en otra posición. Véase Goldenberg et al. *J. Mol. Biol.* 165: 407-413 (1983) y Pan et al. *Gene* 125: 111-114 (1993). La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionar los extremos para formar una molécula circular y, a continuación, cortar la molécula circular en una posición diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con extremos diferentes. Así pues, la permutación circular tiene el efecto de conservar esencialmente la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína al mismo tiempo que se generan nuevos extremos en diferentes posiciones.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo humanizados son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo quiméricos por manipulación genética que tienen porciones, preferiblemente mínimas, procedentes de anticuerpos que no son de humano. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo destinatario) están reemplazadas por restos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, los restos de las regiones flanqueantes de Fv del anticuerpo de humano están reemplazados por los correspondientes restos que no proceden de humano. Los anticuerpos no humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en la región determinante de la complementariedad importada ni en las secuencias flanqueantes. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a las de un anticuerpo que no es de humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones flanqueantes corresponden a las de una secuencia consenso pertinente de humano. Los anticuerpos humanizados también incluyen óptimamente al menos una porción de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, típicamente procedente de un anticuerpo de humano (véase, por ejemplo, Jones et al., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechman et al., 1988. *Nature* 332: 323-329; y Presta, 1992. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596). Se conocen bien en la técnica los métodos para humanizar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que no son de humano. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos que no son de humano a menudo se denominan restos importados que típicamente se toman de un dominio variable importado. La humanización se puede realizar esencialmente tal y como está descrito (véase, por ejemplo: Jones et al., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al., 1988. *Nature* 332: 323-327, Verhoeyen et al., 1988. *Science* 239: 1534-1536; patente de los EE.UU. n.º 4.816.567) mediante la sustitución de las regiones determinantes de complementariedad de humano con las regiones determinantes de complementariedad de roedores. Por este motivo, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable intacto de humano está sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de las regiones determinantes de complementariedad y posiblemente algunos restos de las secuencias flanqueantes están sustituidas por restos de sitios análogos en los anticuerpos de los roedores. También se pueden producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos mediante diferentes técnicas conocidas en la técnica, entre ellas genotecas de exposición en fagos [véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991. *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks et al., 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 581; Cole et al., «Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy», Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., 1991. *J. Immunol.* 147: 86-95]. También se pueden fabricar anticuerpos humanizados mediante la introducción de secuencias que codifican

locus de inmunoglobulina de humano en los animales transgénicos, p. ej., en ratones en los cuales los genes de la inmunoglobulina endógena están inactivados parcialmente o por completo. Tras la exposición al antígeno se observa que tales animales producen anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en los humanos en todos los aspectos, que incluyen reorganización génica, ensamblaje de cadenas y repertorio de anticuerpos. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para poner en práctica tal estrategia (por ejemplo, véanse: patentes de los EE.UU. n.º 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks et al., 1992. *Bio/Technology* 10: 779-783; Lonberg et al., 1994. *Nature* 368: 856-859; Morrison, 1994. *Nature* 368: 812-13; Fishwild et al., 1996. *Nature Biotechnology* 14: 845-51; Neuberger, 1996. *Nature Biotechnology* 14: 826; Lonberg y Huszar, 1995. *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93).

10 Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, un fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede expresar ventajosamente dentro de la célula, p. ej., con un vector de expresión.

Una estrategia preferida para modificar genéticamente una célula de un individuo con un vector de expresión es utilizar un vector vírico. Los vectores víricos ofrecen varias ventajas, entre ellas, una mayor eficacia de transformación y acción selectiva sobre tipos de células específicos, y propagación en los mismos. Los vectores víricos también pueden modificarse con receptores o ligandos específicos que alteran la especificidad de la diana a través de receptores celulares específicos, tal como los receptores de las células cancerosas. Tal capacidad de reconocimiento selectivo se puede utilizar para dirigir la expresión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención en una célula caracterizada por la falta de regulación de la actividad de NF-κB.

Los vectores retrovíricos representan una clase de vectores adecuados para el uso descrito en la presente memoria más arriba. Los retrovirus defectuosos se utilizan habitualmente como vectores para modificar genéticamente las células de los mamíferos, tales como células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos y células de la médula ósea, para que expresen las proteínas recombinantes. Algunas porciones del genoma retrovírico se pueden retirar para comprometer la replicación del retrovirus y a continuación, los retrovirus con replicación defectuosa se pueden empaquetar en viriones, que se pueden utilizar para infectar células diana mediante el uso de un virus cooperador y al mismo tiempo empleando técnicas estándares. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para generar un vector retrovírico capaz de expresar una proteína recombinante en una célula de mamífero (por ejemplo, véase Miller, A. D., 1990. *Blood* 76: 271; Sambrook et al., véase más adelante y las referencias asociadas).

Otro vector de expresión adecuado puede ser un vector adenovírico. Los vectores adenovíricos se han estudiado en profundidad y se utilizan por norma como vectores para transferencia génica. Las ventajas clave de los vectores adenovíricos incluyen la eficacia de transducción relativamente alta de las células en división y quiescentes, tropismo natural a un amplio abanico de tejidos epiteliales y producción fácil de títulos altos. El ADN del adenovirus se transporta al núcleo, pero no se integra en éste. Así pues, el riesgo de mutagénesis con los vectores adenovíricos es mínimo. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para producir y explorar los vectores adenovíricos para tratar las enfermedades [por ejemplo, véase: Russel, W. C., 2000. *J. Gen. Virol.* 81: 57-63; para orientaciones en cuanto al uso del tratamiento del cáncer con vectores adenovíricos, véase, por ejemplo, Seth et al., «Adenoviral vectors for cancer gene therapy». En: P. Seth (ed.) *Adenoviruses: Basic biology to Gene Therapy*, Landes, Austin, TX, págs. 103-120 (1999)].

Un ejemplo específico de un vector adenovírico adecuado es el vector derivado de adenovirus Ad-TK. Este vector expresa el gen de la timidina cinasa (TK, por su nombre en inglés) del virus del herpes para la selección positiva o negativa, e incluye un casete de expresión para las secuencias recombinantes deseadas. Este vector se puede utilizar para infectar células que tienen un receptor de adenovirus, lo que incluye la mayoría de los cánceres de origen epitelial (Sandmair et al., 2000. *Hum. Gene. Ther.* 11: 2197-2205).

Un vector de expresión vírico adecuado puede ser también un vector de adenovirus/retrovirus quimérico que combina componentes retrovíricos y adenovíricos, y que se ha demostrado que es más eficaz que los vectores de expresión tradicionales. En la bibliografía de la técnica se dan a conocer muchas orientaciones para producir y explotar tales vectores (por ejemplo, véase Pan et al., 2002. *Cancer Letters* 184: 179-188).

El vector de expresión se puede administrar de diferentes maneras. Si se utilizan los vectores víricos, el procedimiento puede sacar provecho de su especificidad por la diana y, en consecuencia, puede que no tengan que administrarse tales vectores de forma local en un sitio anatómico afectado por la enfermedad. Sin embargo, la administración local puede proporcionar un tratamiento más rápido y más eficaz. La administración de los vectores víricos también se puede realizar, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o subcutánea en el individuo. Tras la inyección, los vectores víricos circularán hasta que reconozcan las células hospedadoras con una especificidad por la diana adecuada para la infección.

55 También se describe en la presente memoria más arriba una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención como un ingrediente activo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «composición farmacéutica» se refiere a una preparación de uno o varios de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tal como

vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de los ingredientes activos a un organismo.

En la presente memoria, la terminología «ingredientes activos» se refiere al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención responsable del efecto biológico.

- 5 De aquí en adelante, las frases «vehículo fisiológicamente aceptable» y «vehículo farmacéuticamente aceptable», que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no ocasiona una irritación significativa en un organismo ni destruye la actividad biológica ni las propiedades de los ingredientes activos administrados. En estas frases está incluido un adyuvante.

- 10 En la presente memoria, la terminología «excipiente» se refiere a una sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen el carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes glúcidos y tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

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

- 20 Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de generalizada, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido del individuo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de los procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grajeas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

- 25 Las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con la presente especificación se pueden formular, por lo tanto, de una manera convencional con uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

- 30 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa se utilizan en la formulación los penetrantes apropiados para atravesar la barrera. Tales penetrantes se conocen por lo general en la técnica.

- 35 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente mediante la combinación de los ingredientes activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones viscosas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los accesorios adecuados si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grajeas. Los excipientes adecuados son, en particular, sustancias de relleno tales como glúcidos, entre ellos 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 tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tal como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir disgregantes, tal como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

- 45 Los núcleos de las grajeas se proporcionan con revestimientos adecuados. Con este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se puede añadir materia colorante o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o grajeas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de ingredientes activos.

- 50 Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos en una mezcla con material de relleno tal como la lactosa, aglutinantes tal como almidones, lubricantes tal como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tal como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben ser en dosis adecuadas para la vía de

administración elegida.

Para la administración vestibular, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de una manera convencional.

5 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para el uso de acuerdo con la presente especificación se administran convenientemente en una presentación en forma de pulverizador con aerosol en un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar al proporcionar una válvula para administrar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina, para el uso en un dispensador que contienen una mezcla de polvo de los ingredientes activos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

10 La composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede formular para la administración parenteral, p. ej., mediante inyección de bolo o venoclisis continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, la presencia de un conservante. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes para formulación tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

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

20 Alternativamente, antes del uso, los ingredientes activos pueden estar en forma de polvo para la preparación con un vehículo adecuado, p. ej., una solución a base de agua estéril sin pirógenos.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, que utilizan, p. ej., bases convencionales para supositorios tal como manteca de cacao u otros glicéridos.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente especificación incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención) capaz de prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad, o de prolongar la vida del individuo que está en tratamiento.

35 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra suficientemente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, en especial a la luz de la descripción detallada que se da a conocer en la presente memoria.

40 Para cualquier preparación utilizada en los métodos descritos en la presente memoria, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente *in vitro* y a partir de ensayos con cultivos celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseados. Tal información se puede utilizar para determinar con más precisión las dosis útiles en los humanos.

45 La toxicidad y eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o con animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y de los estudios con animales se pueden utilizar para formular un abanico de dosis para uso en los humanos. La dosis puede variar según la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis las puede elegir cada médico en función de la afección del paciente (por ejemplo, véase Fingl et al., 1975 en «The Pharmacological Basis of Therapeutics», capítulo 1, pág. 1).

50 La cantidad dosificada y el intervalo entre dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar una concentración de los ingredientes activos en el plasma o en el cerebro suficiente para ejercer un efecto terapéutico deseado (concentración mínima eficaz, CME). La CME variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la CME dependerán de las características del individuo y de la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden utilizar para determinar la concentración en el plasma.

55 Según la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, puede utilizarse una única toma o una serie de tomas durante el tratamiento, que dura desde varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la curación o

se consigue disminuir el estado patológico.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del individuo a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la manera en que se administra, del criterio del médico de cabecera, etc.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas de unidad de dosificación que contienen los ingredientes activos. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase alveolado. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede también alojar un aviso asociado al contenedor en una forma prescrita por un organismo público que regula la fabricación, uso o venta de las sustancias farmacéuticas, donde dicho aviso refleja que el organismo autorizó la forma de las composiciones o de administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser de una documentación autorizada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para los fármacos con receta o de unas instrucciones para el producto autorizado. También se pueden preparar las composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible, se pueden colocar en una caja adecuada y se pueden etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, como se informa con más detalle más arriba.

Tal y como se describe en la presente memoria más arriba, la composición descrita en la presente memoria se puede utilizar para tratar una enfermedad asociada a una respuesta inmunitaria patológica.

Ejemplos de tales enfermedades incluyen enfermedades asociadas a hipersensibilidad de tipo I (mediada por la IgE o inmediata), enfermedades asociadas a la hipersensibilidad de tipo II (mediada por anticuerpos), enfermedades asociadas a la hipersensibilidad de tipo IV (mediada por linfocitos T), enfermedades asociadas a una hipersensibilidad de tipo retardada (DTH, por su nombre en inglés), enfermedades autoinmunitarias y enfermedades asociadas al trasplante de un injerto.

Otros ejemplos de enfermedades asociadas a la hipersensibilidad incluyen, por ejemplo, enfermedades asociadas a la hipersensibilidad de tipo III (mediada por complejos inmunitarios), enfermedades asociadas a la inflamación, enfermedades asociadas a infecciones y enfermedades asociadas a la hipersensibilidad idiopática.

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo I incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades alérgicas tales como el asma, habones, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia al veneno, alergia a los cosméticos, alergia al látex, alergia a sustancias químicas, alergia a fármacos, alergia a las picaduras de insectos, alergia a la caspa de animales, alergia a las plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia alimentaria.

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo II incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades reumáticas, enfermedades autoinmunitarias reumáticas, artritis reumatoide (Krenn V. et al., 2000. *Histol Histopathol.* 15: 791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., 2001. *Arthritis Res.* 3: 189), enfermedades generalizadas, enfermedades autoinmunitarias generalizadas, lupus eritematoso diseminado (Erikson J. et al., 1998 *Immunol. Res.* 17: 49), esclerosis, esclerosis generalizada (Renaudineau Y., et al. 1999. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6: 156); Chan O. T. et al., 1999. *Immunol. Rev.* 169: 107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, pancreatitis autoinmunitarias, diabetes, diabetes de tipo 1 (Zimmet P. 1996. *Diabetes Res Clin Pract.* 34 Supl: S125), enfermedades tiroideas, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. 2000. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 29: 339), tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S. 2000. *J Immunol* 165 (12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* 1999. 57 (8): 1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* 1999. 57(8): 1759), enfermedades reproductivas autoinmunitarias, enfermedades de ovarios, autoinmunidad ovárica (Garza K. M. et al. *J. Reprod Immunol.* 1998. 37(2): 87), infertilidad antiespermática autoinmunitaria (Diekman A. B. et al., *Am J Reprod Immunol.* 2000. 43(3): 134), muerte fetal repetida (Tincani A. et al., *Lupus* 1998. 7 Supl 2: S107-9), enfermedades neurodegenerativas, neuropatías, neuropatías autoinmunitarias, esclerosis múltiple (Cross A. H. et al., *J Neuroimmunol.* 2001. 112(1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., *J Neural Transm Suppl.* 1997. 49: 77), miastenia grave (Infante A. J. y Kraig E. *Int Rev Immunol.* 1999. 18(1-2): 83), neuropatías motoras (Kornberg A. J. *J Clin Neurosci.* 2000. 7(3): 191), síndrome de Guillain-Barre, neuropatías y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. *Am J Med Sci.* 2000. 319(4): 234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci.* 2000. 319 (4): 204), neuropatías paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofas cerebelares, atrofas cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine J. C. y Honnorat J. *Rev Neurol.* (París) 2000. 156 (1): 23); neuropatías, neuropatías disimunitarias (Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1999. 50: 419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1998. 841: 482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus.* 1998. 7 Supl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus.* 1998. 7 Supl. 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998. 7 Supl 2: S107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y el síndrome de Kawasaki (Paprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 2000. 112 (15-16): 660); enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost.* 2000. 26 (2): 157);

vasculitis, vasculitis necrosante de los vasos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis necrosante focal pauci-inmunitaria, glomerulonefritis semilunar (Noel L. H. *Ann Med Interne* (París). 2000. 151(3): 178); síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999. 14(4): 171); insuficiencia cardíaca, anticuerpos del  $\beta$ -adrenoceptor de tipo agonista en la insuficiencia cardíaca (Wallukat G. et al., *Am J Cardiol*. 1999. 83(12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int*. 1999. 14(2): 114); anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov D. G. et al. *Leuk Lymphoma* 1998. 28 (3-4): 285), enfermedades digestivas, enfermedades autoinmunitarias del tubo digestivo, enteropatías, enteropatía inflamatoria crónica (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol*, enero de 2000; 23 (1): 16), celiaquía (Landau Y. E. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000. 138 (2): 122), miopatías autoinmunitarias, miositis, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren (Feist E. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2000. 123 (1): 92); enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother*,. 1999, 53 (5-6): 234), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis autoinmunitaria (Manns M. P. *J Hepatol*. 2000. 33 (2): 326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg C. P. et al. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999. 11(6): 595).

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo III incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades mediadas por células efectoras inmunitarias tales como, por ejemplo, neutrófilos o macrófagos activados por, por ejemplo, complejos inmunitarios a través de receptores de Fc tales como, por ejemplo, los receptores de Fc $\gamma$ .

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

Ejemplos de enfermedades asociadas a la hipersensibilidad de tipo retardada incluyen, pero sin limitarse a ellas, la dermatitis de contacto y la erupción por fármacos.

Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades glandulares, enfermedades digestivas, dermatopatías, enfermedades hepáticas, neuropatías, miopatías, nefropatías, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conjuntivo y enfermedades generalizadas.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, aterosclerosis (Matsura E. et al., *Lupus*. 1998. 7 Supl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus*. 1998. 7 Supl 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998. 7 Supl 2: S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Paprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr*. 2000. 112 (15-16): 660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al. *Semin Thromb Hemost*. 2000. 26 (2): 157), vasculitis microvascular necrosante, polivasculitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis semilunar y necrosante focal pauci-inmunitaria (Noel L. H. *Ann Med Interne* (París). 2000. 151 (3): 178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al. *J Clin Apheresis* 1999. 14 (4): 171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. et al., (1999) *Am J Cardiol*. 83 (12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int*. 1999. 14 (2): 114; Semple J. W. et al., *Blood* 1996. 87 (10): 4245), anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov D. G. et al. *Leuk Lymphoma* 1998 28 (3-4): 285; Sallah S. et al. *Ann Hematol*. 1997. 74 (3): 139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al. *J Clin Invest*. 1996. 98 (8): 1709) y autoinmunidad contra los linfocitos T cooperadores (Caparossi A. P. et al. *Viral Immunol*. 1998. 11 (1): 9).

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

- Ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, pancreatitis, diabetes de tipo 1, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmunitaria antiespermática, prostatitis autoinmunitaria y enfermedades del síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I incluyen, pero sin limitarse a ellas, pancreatitis autoinmunitarias, diabetes de tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth G. S. 1990. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 647; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996. 34 Supl: S125), enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Grave (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000. 29 (2): 339; Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol.* 1993. 92 (1): 77), tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S., *J Immunol.* 2000. 165 (12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* 1999. 57 (8): 1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* 1999. 57 (8): 1759), autoinmunidad ovárica (Garza K. M. et al., *J Reprod Immunol.* 1998. 37 (2): 87), infertilidad autoinmunitaria antiespermática (Diekman A. B. et al., *Am J Reprod Immunol.* 2000. 43 (3): 134), prostatitis autoinmunitaria (Alexander R. B. et al., *Urology* 1997, 50 (6): 893) y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I (Hara T. et al., *Blood.* 1991. 77 (5): 1127).
- Ejemplos de enfermedades digestivas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, enteropatías inflamatorias crónicas (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol.* 2000. 23 (1): 16), celiaquía (Landau Y. E. y Shoenfeld Y. *Harefuah* 2000. 138 (2): 122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.
- Ejemplos de dermatopatías autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades ampollosas autoinmunitarias de la piel tales como, pero sin limitarse a ellas, pénfigo vulgar, pénfigo ampolloso y pénfigo foliáceo.
- Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitaria (Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol.* 1990. 54 (3): 382), cirrosis biliar primaria (Jones D. E. *Clin Sci (Colch)* 1996. 91 (5): 551; Strassburg C. P. et al. *Eur J Gastroenter Hepatol.* 1999. 11(6): 595) y hepatitis autoinmunitaria (Manns M. P. *J Hepatol.* 2000. 33 (2): 326).
- Ejemplos de neuropatías autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, esclerosis múltiple (Cross A. H. et al., *J Neuroimmunol.* 2001. 112 (1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., *J Neural Transm Suppl.* 1997. 49: 77), miastenia grave (Infante A. J. y Kraig E., *Int Rev Immunol.* 1999, 18 (1-2): 83; Oshima M. et al. *Eur. J. Immunol.* 1990. 20: 2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg A. J. *J Clin Neurosci.* 2000. 7: 191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunitarias (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); neuropatías paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica y síndrome de la persona rígida (Hiemstra H. S. et al., *Proc. Natl Acad Sci USA* 2001. 98 (7): 3988); síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofas cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y polendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine J. C. y Honnorat J. *Rev Neurol (París)* 2000. 156 (1). 23); neuropatías disímunitarias (Nobile-Orazio E. et al. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1999. 50: 419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al. *Ann N Y Acad Sci.* 1998. 841: 482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994. 57 (5). 544) y enfermedades neurodegenerativas.
- Ejemplos de miopatías autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, miositis, miositis autoinmunitaria y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol.* 2000. 123 (1): 92) y enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother.* 1999. 53 (5-6): 234).
- Ejemplos de nefropatías autoinmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, nefritis y nefritis intersticial autoinmunitaria (Kelly C. J. *J Am Soc Nephrol.* 1990. 1 (2): 140).
- Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la reproducción incluyen, pero sin limitarse a ellas, la muerte fetal repetida (Tincani A. et al., *Lupus* 1998. 7 Supl. 2: S107-9).
- Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias del tejido conjuntivo incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunitarias del oído (Yoo T. J. et al. *Cell Immunol.* 1994 (157 (1): 249) y enfermedades autoinmunitarias del oído interno (Gloddek B. et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1997. 830: 266).
- Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias generalizadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, lupus eritematoso diseminado (Erikson J. et al., *Immunol Res.* 1998. 17 (1-2): 49) y esclerosis generalizada (Renaudineau Y. et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999. 6 (2): 156); Chan O. T. et al., *Immunol. Rev.* 1999. 16 : 107).
- Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedad protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades micóticas, enfermedades por micoplasmas y enfermedades priónicas.
- Ejemplos de enfermedades relacionadas con los trasplantes incluyen, pero sin limitarse a ellas, rechazo del injerto, rechazo crónico del injerto, rechazo subagudo del injerto, rechazo hiperagudo del injerto, rechazo inmediato del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped.

Ejemplos de injertos incluyen isoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, injertos celulares, injertos de tejido, injertos de órganos e injertos de extremidades.

Ejemplos de injertos celulares incluyen, pero sin limitarse a ellos, injertos de células madre, injertos de células progenitoras, injertos de células hematopoyéticas, injertos de células embrionarias e injerto de células nerviosas.

- 5 Ejemplos de injertos de tejido incluyen, pero sin limitarse a ellos, injertos de piel, injertos de hueso, injertos de nervios, injertos de intestino, injertos de córnea, injertos de cartílago, injertos de tejido cardíaco, injertos de válvula cardíaca, injertos dentales, injertos de folículos pilosos e injertos de músculo.

Ejemplos de injertos de órganos incluyen, pero sin limitarse a ellos, injertos de riñón, injertos de corazón, injertos de piel, injertos de hígado, injertos de páncreas, injertos de pulmón e injertos de intestino.

- 10 Ejemplos de injertos de extremidades incluyen, pero sin limitarse a ellos, injertos de brazo, injertos de pierna, injertos de mano, injertos de pie, injertos de dedos de la mano, injertos de dedos del pie e injertos de órganos sexuales.

Ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen, pero sin limitarse a ellas; lesiones, enfermedades neurodegenerativas, úlceras, inflamación asociada a implantes protésicos, menstruación, choque septicémico, choque anafiláctico, síndrome del choque tóxico, caquexia, necrosis, gangrena, miositis e inflamación idiopática.

- 15 Ejemplos de implantes protésicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, implantes de mama, implantes de silicona, implantes dentales, implantes de pene, implantes cardíacos, articulaciones artificiales, productos sanitarios para reparación de fracturas de hueso, implantes de sustitución de hueso, implantes para administrar fármacos, catéteres, marcapasos, tubos de mascarillas respiratorias y endoprótesis vasculares.

- 20 Ejemplos de úlceras incluyen, pero sin limitarse a ellas, úlceras de piel, úlceras de decúbito, úlceras gástricas, úlceras pépticas, úlceras vestibulares, úlceras nasofaríngeas, úlceras esofágicas, úlceras duodenales, colitis ulcerosa y úlceras digestivas.

- 25 Ejemplos de lesiones incluyen, pero sin limitarse a ellas, abrasiones, hematomas, cortes, heridas penetrantes, laceraciones, heridas por impacto, conmociones, contusiones, quemaduras térmicas, sabañón, quemaduras químicas, quemaduras solares, desecaciones, quemaduras por radiación, quemaduras por radiactividad, inhalación de humo, desgarró muscular, distensión muscular, desgarró tendinoso, distensión tendinosa, distensión de ligamentos, desgarró de ligamentos, hiperextensiones, desgarró de cartílago, fracturas óseas, pinzamiento de nervios y heridas de bala.

- 30 Ejemplos de inflamaciones musculoesqueléticas incluyen, pero sin limitarse a ellas, inflamaciones musculares, miositis, inflamaciones tendinosas, tendinitis, inflamación de ligamentos, inflamación de cartílagos, artritis, inflamaciones sinoviales, síndrome del túnel carpiano e inflamaciones óseas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aproximadamente» se refiere a  $\pm 10\%$ .

Se espera que durante la vigencia de esta patente se desarrollen muchas técnicas diagnósticas médicas relevantes y el alcance de la terminología «que detecta» cuando se refiere al antígeno diana pretende incluir todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

- 35 Otros objetos, ventajas y peculiaridades nuevas de la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica tras examinar los ejemplos que vienen a continuación. Adicionalmente, cada una de las diferentes realizaciones y aspectos de la presente invención tal y como se delinean en la presente memoria más arriba y tal y como se reivindican en el apartado de reivindicaciones que vendrá más adelante encuentra apoyo experimental en los ejemplos que vienen a continuación.

#### 40 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los ejemplos que vienen a continuación, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitante.

- 45 Por lo general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» Sambrook et al., (1989); «Current Protocols in Molecular Biology», volúmenes I-III, Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland, (1989); Perbal, «A Practical Guide to Molecular Cloning», John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., «Recombinant DNA», Scientific American Books, Nueva York; Birren et al., (eds) «Genome Analysis: A Laboratory Manual Series», vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal y como se presentan en las patentes de los EE.UU. n.º 4.666.828, 4.683.202, 4.801.531, 5.192.659 y 5.272.057; «Cell Biology: A Laboratory Handbook», volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); «Current Protocols in Immunology», volúmenes I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), «Basic and Clinical Immunology» (8.<sup>a</sup> edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman and Co, Nueva

York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la patente y la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. n.º 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., ed. (1984); «Nucleic Acid Hybridization» Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); «Transcription and Translation» Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); «Animal Cell Culture» Freshney, R. I., ed. (1986); «Immobilized Cells and Enzymes» IRL Press, (1986); «A Practical Guide to Molecular Cloning» Perbal, B., (1984) y «Methods in Enzymology», vol. 1-317, Academic Press; «PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications», Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., «Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual» CSHL Press (1996). Otras referencias generales se dan a conocer a lo largo de este documento. Los procedimientos en éste se cree que se conocen bien en la técnica y se dan a conocer para comodidad del lector.

A menos que se defina de otra manera, toda la terminología científica y técnica utilizada en la presente memoria tiene el mismo significado que habitualmente conoce el experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la práctica o en las comprobaciones de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.

#### Ejemplo 1

##### Generación de anticuerpos monoclonales capaces de fijarse a la NIK humana con afinidad/especificidad óptima

Tal y como se describe más arriba, ningún tratamiento, ni ningún tratamiento satisfactorio, está disponible para muchas enfermedades asociadas a la ausencia de regulación de la actividad del NF- $\kappa$ B, entre ellas las enfermedades malignas y las enfermedades asociadas a respuestas inmunitarias patológicas, tales como enfermedades autoinmunitarias, alérgicas, inflamatorias y relacionadas con un trasplante. Ya que la NIK es un activador crítico del NF- $\kappa$ B, una estrategia potencialmente potente para tratar tales enfermedades implica la identificación de anticuerpos capaces de fijarse específicamente a la NIK y, de esta forma, impedir o inhibir la activación del NF- $\kappa$ B debida a la NIK. Tales anticuerpos también tendrían utilidad como reactivos de detección que permiten la caracterización de aspectos normales y patológicos de procesos biológicos y bioquímicos en los que interviene la NIK. La técnica anterior, sin embargo, no ha conseguido proporcionar anticuerpos adecuados u óptimamente adecuados para tales propósitos. Cuando la presente invención se lleva a la práctica, tales anticuerpos se identificaron inesperadamente, con lo que se superaron las limitaciones de la técnica anterior, como se describe a continuación.

##### Materiales y métodos:

Producción de anticuerpos: se generaron sueros inmunitarios murinos anti-NIK mediante la inmunización de ratones SJL con péptidos procedentes de la NIK, tal y como ya se había descrito [Eshhar Z., en «Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine», capítulo 1, Springer T. A., (eds.) Timothy A., Plenum Publishing Corp., Nueva York (1985)].

Cada uno de los péptidos del conjunto no solapante derivado de la NIK que se muestran en la tabla 1 se utilizó para inmunizar grupos de ratones. En las figuras 1 y 2 se muestran, respectivamente, la posición de los péptidos inmunizantes con respecto a los dominios del polipéptido de NIK, y la secuencia aminoacídica completa de la NIK de humano que incluye la posición de los péptidos inmunizantes.

40

Tabla 1. Péptidos procedentes de NIK utilizados para las inmunizaciones

Designación del péptido *	Secuencia aminoacídica**	SEQ ID n.º
60-76	DVITKGTAKGSEAGPA	1
86-99	CENSQEFSPTFSER	2
135-150	KGKRRSKARKKRKKS	3
215-228	EGLRPALPRSELHK	4
363-378	RGSRSEPSPKTEDNE	5
385-398	KLKPVDEYREEVH	6
405-420	RLGRGSFGEVHRMEDK	7
427-441	CAVKKVRLEVFRAEEL	8
509-523	RRILHGDVKADNVLL	9
605-619	CLKIASEPPPVEIP***	10
635-650	RKEPIHRVSAELGGK	11
666-681	RGEYKEPRHPPPNQAN	12
696-712	RAPGPRPAEETTGRAPK	13
720-736	EPPEPNKSPPLTSLKEE	14
752-767	PARNPSSPERKATVPE***	15
769-783	ELQQLEIELFLNLSL	16
807-822	DDSEKNPSKASQSSRD	17
836-851	EARSSSWNMVLARGRP	18
871-885	EHLHIREFHRVKVGD	19
904-917	KDQGPVRYDMEVPD	20

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

\*\*Los péptidos se seleccionaron o bien de la secuencia de NIK que tiene un resto Cys natural en el extremo amino o bien, en el caso de los péptidos mostrados sin un resto Cys en el extremo amino, se sintetizaron con un resto de Cys adicional en el extremo amino y se utilizaron tal cual para las inmunizaciones.

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

10 Producción de la NIK recombinante de humano: para la expresión de la NIK recombinante de humano fusionada a myc (myc-NIK) o a una etiqueta de afinidad de polihistidinas (His-NIK), se transfectaron  $5 \times 10^6$ , o  $2 \times 10^6$  células 293T, respectivamente, con el vector de expresión PCS3MTNIK que codifica la NIK etiquetada con Myc (secuencia de NIK como en WO9737016) o pcHis-NIK que codifica la NIK etiquetada con His, respectivamente. Las células se transfectaron con el método del fosfato de calcio [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] en una placa de cultivo con un diámetro de 10 cm utilizando 20  $\mu\text{g}$  del ADN del vector de expresión. Transcurridas 24 horas desde la transfección, las células transfectadas con PCS3MTNIK o pcHis-NIK se recogieron, se sedimentaron y se lisaron en 1,5 ml o 1 ml, respectivamente, de tampón de lisis de proteínas con NP-40 al 1%.

15 Inmunoprecipitación: para la inmunoprecipitación de la proteína de fusión de NIK recombinante desde el lisado de proteínas del transfectante mediante el uso de suero inmunitario, se mezcló 1,5  $\mu\text{l}$  del suero inmunitario con 25  $\mu\text{l}$  de perlas conjugadas con proteína G y 50  $\mu\text{l}$  del lisado, y se completó el volumen hasta 750  $\mu\text{l}$  con el tampón de lisis. Se incubó la mezcla a 4 °C durante 2 horas. Tras la incubación, se lavaron las perlas tres veces con el tampón de lisis, se hirvieron en 30  $\mu\text{l}$  del tampón de muestra y se centrifugaron en microcentrifuga a 15.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante (inmunoprecipitado) se recogió y se analizó en él la presencia de la NIK de humano por SDS-PAGE al 10%.

Análisis de inmunotransferencia Western: para una de transferencia en ranura (*slot blot*) de 20 pocillos para cribado múltiple de BioRad, una alícuota de 180  $\mu\text{l}$  del lisado de células 293T transfectadas con PCS3MTNIK se analizó en gel preparativo de SDS-PAGE. Como control positivo se utilizó el anticuerpo anti-myc a una dilución de 1:1000.

25 ELISA: el lisado de células transfectadas con pcHis-NIK se diluyó 25 veces en tampón de fijación, y se utilizaron 50  $\mu\text{l}$ /pocillo para revestir los pocillos de la placa de ELISA. La detección del péptido conjugado a SAB o a NIK del revestimiento se realizó con una dilución de 1:100 de suero inmunitario anti-NIK, y el ensayo se reveló con el anticuerpo antirratón de oveja conjugado a HRP usando ABTS como sustrato enzimático. La  $\text{DO}_{405}$  de las muestras se determinó tras un tiempo de reacción de 20 minutos.

esultados experimentales:

La capacidad que tenían los anticuerpos anti-NIK comerciales para detectar la NIK se evaluó vía ensayos de inmunoprecipitación/inmunotransferencia Western de myc-NIK en los lisados de proteínas de las células 293T transfectadas con PCS3MTNIK. Como se puede observar en la tabla 2, ninguno de los anticuerpos comerciales analizados permite la detección óptima de la NIK recombinante.

Tabla 2. Capacidad de los anticuerpos anti-NIK comerciales a la hora de detectar la NIK

Tipo anticuerpo	de	Proveedor	Péptido inmunizador procedente de NIK	Ensayo*	Resultados
Acm IgG de ratón		Santacruz	700-947	ITW	NIK indetectable
Policlonal cabra	de	Santacruz	«Extremo amino»	ITW	Detección débil de NIK sobreexpresada
Policlonal conejo	de	Santacruz	700-947	IP, ITW	Varía según el lote Detección moderada de la NIK sobreexpresada
Policlonal conejo	de	Prosci Inc.	931-947	ITW	Varía según el lote Detección moderada de NIK sobreexpresada (+)
Policlonal conejo	de	Pharmingen	931-947	ITW	Varía según el lote Detección moderada de NIK sobreexpresada (++)

\* ITW: inmunotransferencia Western; IP: inmunoprecipitación.

La capacidad que tienen los sueros de ratones inmunizados con los péptidos procedentes de NIK a la hora de detectar la NIK se analizó mediante análisis de inmunotransferencia Western sólo o mediante inmunoprecipitación con proteína G del lisado de las células transfectadas con PCS3MTNIK. Tal y como se muestra en la figura 3, el antisuero de ratones inmunizados con el péptido 405-420, 635-650, 666-681 o 696-712 se encontró que era capaz de detectar la NIK con eficacia por análisis de inmunotransferencia Western. Los péptidos 405-420 y 635-650, de los extremos amino y carboxilo del dominio cinasa de NIK, respectivamente, se encontró que eran muy eficaces a la hora de generar un excelente anticuerpo para el análisis de inmunotransferencia Western. El péptido 666-681 del extremo carboxilo del dominio cinasa de NIK y el 696-712 de la región del extremo carboxilo, respectivamente, se encontró también que eran adecuados para preparar anticuerpos idóneos para el análisis de inmunotransferencia Western (figuras 1 y 2 y tabla 3).

Tal y como se muestra en las figuras 4a-d, cuando la myc-NIK se inmunoprecipitó con cada uno de los diferentes anticuerpos preparados de lisados antes del análisis por inmunotransferencia Western (utilizando anti-myc para la detección en el análisis de inmunotransferencia Western), los antisueros de los ratones inmunizados con el péptido 60-76, 86-99, 135-150 o 215-228 (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) se encontró que cada uno tenía la capacidad de inmunoprecipitar la NIK (mostrada por la flecha). La capacidad que tenían los sueros inmunitarios a la hora de detectar la NIK se analizó también por ELISA en un lisado de células transfectadas con pcHis-NIK.

El anticuerpo preparado con péptidos de la subregión del extremo carboxilo del dominio cinasa 635-650, o el dominio del extremo carboxilo de NIK 666-681, 696-712 y 752-767 se halló que eran muy eficientes para la inmunoprecipitación de NIK (tabla 3). Tal y como se muestra en la figura 5, el suero de los ratones inmunizados con el péptido 427-441 se halló que era capaz de detectar la NIK por ELISA con una sensibilidad muy alta. El suero de los ratones inmunizados con el péptido 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 se halló también que eran capaces de detectar la NIK por ELISA con claridad.

Así pues, tal y como se resume en la tabla 3, los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen la capacidad de detectar con eficacia la NIK de humano, o porciones específicas de la misma, mediante el análisis por inmunotransferencia Western, mediante el ensayo de inmunotransferencia Western/IP, y/o por ELISA.

El anticuerpo preparado utilizando la subregión del extremo carboxilo de la cinasa NIK se halló que destacaba tanto en los lotes de análisis por inmunotransferencia Western como en la inmunoprecipitación de NIK.

Desde un punto de vista crítico, la capacidad que los anticuerpos de la presente memoria se describe que tienen para fijarse específicamente a:

(i) secuencia aminoacídica 60-76 (SEQ ID n.º 1), 86-99 (SEQ ID n.º 2), 135-150 (SEQ ID n.º 3), 215-228 (SEQ ID n.º 4), 363-378 (SEQ ID n.º 5) o 385-398 (SEQ ID n.º 6) de la región del extremo amino de NIK;

- (ii) secuencia aminoacídica 401-681 de NIK (SEQ ID n.º 22), que comprende la región cinasa completa (restos aminoacídicos 401-681);
- (iii) secuencia aminoacídica 405-420 (SEQ ID n.º 7), 427-441 (SEQ ID n.º 8), 509-523 (SEQ ID n.º 9), 605-619 (SEQ ID n.º 10), o 635-650 (SEQ ID n.º 11) de la región cinasa de NIK, o
- 5 (iv) restos aminoacídicos 666-681 (SEQ ID n.º 12), 696-712 (SEQ ID n.º 13), 752-767 (SEQ ID n.º 15), 807-822 (SEQ ID n.º 17), 836-851 (SEQ ID n.º 18), 871-885 (SEQ ID n.º 19) o 904-917 (SEQ ID n.º 20) de la región del extremo carboxilo de NIK son únicos respecto a los anticuerpos anti-NIK de la técnica anterior (compárese con la tabla 2).

Tabla 3. Resumen de la capacidad de fijación de los sueros anti-NIK que se han generado

Origen del péptido inmunizador en NIK*	Subregión	Designación del péptido	Ensayo de detección		
			ITW**	IP***	ELISA
Región del extremo amino		60-76 (SEQ ID n.º 1)		+	+
		86-98 (SEQ ID n.º 2)		+	+
		135-150 (SEQ ID n.º 3)		+	+
		215-228 (SEQ ID n.º 4)		+	+
		363-378 (SEQ ID n.º 5)		+	+
		385-398 (SEQ ID n.º 6)		+	+
Dominio cinasa	Extremo amino	405-420 (SEQ ID n.º 7)	+++	+++	+
		427-441 (SEQ ID n.º 8)		+	+++
		509-523 (SEQ ID n.º 9)		+	+
		605-619 (SEQ ID n.º 10)		+	+
	Extremo carboxilo	635-650 (SEQ ID n.º 11)	+++	+++	+
Región del extremo carboxilo		666-681 (SEQ ID n.º 12)	++	+++	+
		696-712 (SEQ ID n.º 13)	+	+++	+
		752-767 (SEQ ID n.º 15)		+++	+
		836-851 (SEQ ID n.º 18)		+	+
		871-885 (SEQ ID n.º 19)		+	+
		904-917 (SEQ ID n.º 20)		+	+

10 \*Las regiones del extremo amino, cinasa y del extremo carboxilo de NIK, respectivamente, corresponden a los restos de aminoácidos 1-400, 401-653 y 654-947 de la secuencia de NIK; \*\* ITW: inmunotransferencia Western; \*\*\* IP: inmunoprecipitación.

Tras mucha experimentación se generaron inesperadamente numerosas preparaciones de anticuerpos, cada uno capaz de fijarse óptimamente a un epítipo de NIK muy específico tal como un epítipo de la región cinasa, del extremo amino o del extremo carboxilo. Notablemente, la capacidad que tienen las preparaciones de anticuerpos descritos en la presente memoria a la hora de fijarse específicamente a la región cinasa de NIK, o a la hora de fijarse específicamente a alguna de las diferentes porciones específicas de regiones cinasa, o del extremo amino o del carboxilo de la NIK, es única respecto a los anticuerpos que se fijan a la NIK en la técnica anterior. Los anticuerpos destacables que son capaces de detectar con eficacia la NIK en los análisis de inmunotransferencia Western se prepararon con la subregión del extremo amino o del extremo carboxilo del dominio cinasa de NIK, o los que son capaces de detectar con eficacia la NIK mediante ELISA se prepararon con el péptido del dominio cinasa 427-441, o los que son capaces de detectar con eficacia la NIK por inmunoprecipitación se prepararon con los péptidos del dominio del extremo carboxilo de NIK, incluida la subregión del extremo carboxilo del dominio cinasa (véase la tabla 3). Así pues, los anticuerpos descritos en la presente invención se pueden utilizar para regular una actividad bioquímica, tal como una actividad cinasa, de la NIK. Las preparaciones de anticuerpos descritas en la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento óptimo de tales enfermedades ya que tal actividad se requiere para la activación del NF-κB, las preparaciones de anticuerpo descritas en la presente invención se pueden utilizar para la regulación óptima de la activación de NF-κB, y ya que la falta de regulación de la actividad de NF-κB está asociada a la patogenia de numerosas enfermedades, tales como las asociadas a respuestas inmunitarias patológicas, y con la de diferentes enfermedades malignas. Además, en virtud de: (i) hacer posible únicamente y con eficacia la detección de la región cinasa de NIK, o una porción de la región cinasa de NIK; y (ii) hacer posible la detección, o la detección óptima de la NIK, o de cualquiera de las diferentes porciones específicas de las regiones del extremo carboxilo o amino de la NIK, las preparaciones de los anticuerpos descritas en la presente memoria se pueden explotar para

caracterizar, o para caracterizar óptimamente, aspectos de procesos/estados biológicos/bioquímicos normales/patológicos en los que interviene la NIK o porciones específicas de la misma.

#### Preparación de anticuerpos monoclonales

Se prepararon anticuerpos monoclonales tal y como describe Eshhar Z. en: «Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine», capítulo 1, Springer T. A. (eds) Timothy A., Plenum Publishing Corp, Nueva York (1985) mediante el uso del bazo de ratones positivos expuestos al péptido de SEQ ID n.º 7, 11 y 12 de los extremos amino y carboxilo de la cinasa para fusión.

Los sobrenadantes de cultivo de tres hibridomas, desarrollados contra los péptidos de SEQ ID n.º 7, 11 y 12 de los extremos amino y carboxilo de la cinasa (Pep 7 81.1, Pep 11 355.8 y Pep 12 629 62 18), pep 12 se encuentra al comienzo del extremo carboxilo, se ensayaron con el análisis por inmunotransferencia Western. Así pues, se inocularon  $1,5 \times 10^6$  células 293T en placas de 10 cm y se transfectaron después de 24 horas con pCS3MTNIK (que codifica la NIK etiquetada con myc). Después de 24 horas de la transfección, las células se recogieron y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis con NP40 al 1%. Se depositaron en SDS-PAGE al 10% 40 µl del lisado por carril junto con un lisado de células transfectadas con pcDNA3 como control. Las inmunotransferencias Western se hibridaron con el sobrenadante del cultivo de hibridoma correspondiente a una dilución de 1:500. Los resultados resumidos en la figura 6 muestran que los anticuerpos monoclonales, desarrollados contra los péptidos de SEQ ID n.º 7, 11 y 12 del extremo carboxilo y amino de la cinasa, de igual forma que los anticuerpos policlonales equivalentes, son capaces de detectar la NIK con análisis por inmunotransferencia Western.

El lisado de 293-T que expresa la proteína NIK etiquetada con myc se utilizó también para comprobar la capacidad de inmunoprecipitación de los mismos tres anticuerpos monoclonales contra NIK: 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 del sobrenadante del cultivo de hibridoma y se incubaron a aproximadamente 22 °C durante 1 hora. Las perlas se lavaron 3 veces con un tampón de lisis con NP-40 al 1% y se utilizaron para la inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación (IP) se llevó a cabo durante 2 horas a +4 °C. Tras la IP, las perlas se lavaron 3 veces y se hirvieron con 50 µl del tampón de Laemli y 25 µl del sobrenadante se cargaron en SDS-PAGE al 10% (figura 7).

Los resultados resumidos en la figura 7 muestran que todos los anticuerpos monoclonales analizados eran capaces de inmunoprecipitar la NIK, excepto para la IgG de control negativo (figura 7, carril 7). El anticuerpo purificado por afinidad de la ascitis era mejor que el anticuerpo purificado de los sobrenadantes de hibridoma (compárense los carriles 1 y 4 de la figura 7).

#### 30 Detección de la NIK endógena

Para explorar la posibilidad de detectar la NIK endógena, se lisaron las células Ramos ( $2-4 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^8$  células/ml) y se inmunoprecipitó la NIK con la ascitis de ratón purificada por afinidad con NIK, que contiene el anticuerpo NIK-81 purificado (a saber, anticuerpo monoclonal Pep 7 81.1) conjugado a perlas de Sepharose con proteína G (conjugado como se describe más arriba). El anticuerpo NIK-81 se purificó a partir de líquido ascítico de ratón en columnas de afinidad en las que se había conjugado el péptido utilizado para preparar el anticuerpo (SEQ ID n.º 7).

Los anticuerpos se purificaron de líquido ascítico mediante purificación por afinidad con perlas Affigel (Aaffigel 15 de BioRad) entreconectadas con SAB (Pierce, cat. 771116) conjugadas al péptido sintético utilizado para la inmunización del ratón (péptido de SEQ ID n.º 7). Se lavó 1 ml de Affigel 15 con agua bidestilada fría, tres veces, 10 ml cada vez. El Affigel lavado se mezcló con 1 ml del péptido conjugado a SAB a 4 °C durante 12-16 horas en un rotador. Se bloqueó el éster por adición de 100 µl de gel en etanolamina a 1 M (pH 8,0)/ml y se incubó durante una hora a 4 °C en un rotador.

Para la purificación del anticuerpo, la ascitis precipitada con sulfato de amonio al 50% se dializó frente a PBS durante 1630 horas a 4 °C. Tras la diálisis, se incubaron las alícuotas con 1 ml de perlas de péptido-SAB-Affigel procesadas 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, luego se lavó una vez con Tris a 10 mM, pH 7,5 que contiene NaCl a 1 M y se lavó otra vez con PBS. Los anticuerpos se eluyeron de la columna con una solución que contenía glicina HCl a 100 mM, pH 2,7 y NaCl a 0,5 M. Se recogieron fracciones de 1 ml en tubos que contenían 40 µl de Tris base para neutralizar el 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 inmunotransferencia Western con el anticuerpo NIK-81 y el kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto (Pierce). Se verificó la NIK (y para la comparación, IKK1) en las células Ramos que carecían de NIK (que expresan constitutivamente el lentivirus pSUPER-NIK) y en las células Ramos que contenían la NIK endógena (transducida con GFP lentivírica). Los resultados obtenidos (figura 8) muestran que el anticuerpo NIK-81 es capaz de inmunoprecipitar la NIK endógena con eficacia, y de detectarla por análisis de inmunotransferencia Western.

Detección de la NIK murina mediante el anticuerpo NIK-81

Ya que los anticuerpos murinos son herramientas valiosas para la investigación *in vivo*, en particular en los modelos murinos, se exploró si el anticuerpo monoclonal NIK-81 es capaz de detectar la NIK murina. Con ese fin, las células HeLa ( $1,2 \times 10^6$  células inoculadas en una placa Petri de 9 cm) se transfectaron con 5  $\mu\text{g}$  de plásmido, que codifica la NIK humana (hNIK) o la NIK de ratón (mNIK), o fragmentos correspondientes de las mismas (hNIK 188-947 y mNIK 87-942) o el plásmido vacío de control (pcHIS), mediante el método de precipitación con fosfato de calcio.

Veinticuatro horas después de la transfección, en los lisados totales de las células se analizó la sobreexpresión transitoria de la NIK de humano o de ratón mediante análisis de inmunotransferencia Western con el anticuerpo anti-NIK-81 (dilución de 1:5000 de líquido ascítico).

10 Los resultados que se resumen en la figura 9 muestran que el anticuerpo monoclonal anti-NIK-81 es capaz de fijarse y detectar la NIK de humano, la NIK murina y fragmentos de las mismas.

Los clones de hibridoma Pep 7-81.1, Pep 11-3555.8 y Pep 12-629-62-18 se depositaron el 2 de octubre de 2003 en la *Collection Nationale de Culture de Microorganismes* (CNCM), Instituto Pasteur, París, siguiendo el Tratado de Budapest y se les concedieron los n.º de depósito I-3092, I-3093, I-3094, respectivamente.

15

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.

<120> ANTICUERPOS ANTI-NIK Y USOS DE LOS MISMOS

<130> M1530 EP/2 S3

5 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223>/Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 1

Asp Val Ile Thr Lys Gly Thr Ala Lys Glu Gly Ser Glu Ala Gly Pro  
 1                      5                      10                      15

15

Ala

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223>/Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 2

Cys Glu Asn Ser Gln Glu Phe Ser Pro Thr Phe Ser Glu Arg  
 1                      5                      10

25 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /Nota= «Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 3

ES 2 437 065 T3

Lys Gly Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 4

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

10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 5

Arg Gly Ser Arg Ser Arg Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu  
1 5 10 15

20 <210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 6

Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His  
1 5 10

<210> 7

30 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 7

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

5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 8

Ala Val Lys Lys Val Arg Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu  
 1                      5                                      10                                      15

15 <210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 9

Arg Arg Ile Leu His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu  
 1                      5                                      10                                      15

<210> 10

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 10

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

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 11

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

10 <210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 12

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

<210> 13

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<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

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<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

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 15

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

<210> 16

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

20 <400> 16

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

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 17

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

30

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: 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

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

15 <400> 19

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

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: péptido sintético»

<400> 20

Lys	Asp	Gly	Gln	Pro	Val	Arg	Tyr	Asp	Met	Glu	Val	Pro	Asp
1				5					10				

25

<210> 21

<211> 947

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

30 <400> 21

ES 2 437 065 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

ES 2 437 065 T3

Glu Leu His Lys Leu Ile Ser Pro Leu Gln Cys Leu Asn His Val Trp  
 225 230 235 240  
 Lys Leu His His Pro Gln Asp Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Thr His  
 245 250 255  
 Pro Phe Pro Tyr Ser Arg Leu Pro His Pro Phe Pro Phe His Pro Leu  
 260 265 270  
 Gln Pro Trp Lys Pro His Pro Leu Glu Ser Phe Leu Gly Lys Leu Ala  
 275 280 285  
 Cys Val Asp Ser Gln Lys Pro Leu Pro Asp Pro His Leu Ser Lys Leu  
 290 295 300  
 Ala Cys Val Asp Ser Pro Lys Pro Leu Pro Gly Pro His Leu Glu Pro  
 305 310 315 320  
 Ser Cys Leu Ser Arg Gly Ala His Glu Lys Phe Ser Val Glu Glu Tyr  
 325 330 335  
 Leu Val His Ala Leu Gln Gly Ser Val Ser Ser Ser Gln Ala His Ser  
 340 345 350  
 Leu Thr Ser Leu Ala Lys Thr Trp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Ser Arg  
 355 360 365  
 Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu Gly Val Leu Leu Thr Glu  
 370 375 380  
 Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His Trp Ala  
 385 390 395 400  
 Thr His Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg  
 405 410 415  
 Met Glu Asp Lys Gln Thr Gly Phe Gln Cys Ala Val Lys Lys Val Arg  
 420 425 430  
 Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu Met Ala Cys Ala Gly Leu Thr  
 435 440 445  
 Ser Pro Arg Ile Val Pro Leu Tyr Gly Ala Val Arg Glu Gly Pro Trp  
 450 455 460  
 Val Asn Ile Phe Met Glu Leu Leu Glu Gly Gly Ser Leu Gly Gln Leu  
 465 470 475 480  
 Val Lys Glu Gln Gly Cys Leu Pro Glu Asp Arg Ala Leu Tyr Tyr Leu  
 485 490 495  
 Gly Gln Ala Leu Glu Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Arg Ile Leu  
 500 505 510  
 His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Ser Asp Gly Ser  
 515 520 525

ES 2 437 065 T3

His Ala Ala Leu Cys Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp  
 530 535 540  
 Gly Leu Gly Lys Ser Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu  
 545 550 555 560  
 Thr His Met Ala Pro Glu Val Val Leu Gly Arg Ser Cys Asp Ala Lys  
 565 570 575  
 Val Asp Val Trp Ser Ser Cys Cys Met Met Leu His Met Leu Asn Gly  
 580 585 590  
 Cys His Pro Trp Thr Gln Phe Phe Arg Gly Pro Leu Cys Leu Lys Ile  
 595 600 605  
 Ala Ser Glu Pro Pro Pro Val Arg Glu Ile Pro Pro Ser Cys Ala Pro  
 610 615 620  
 Leu Thr Ala Gln Ala Ile Gln Glu Gly Leu Arg Lys Glu Pro Ile His  
 625 630 635 640  
 Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu Gln  
 645 650 655  
 Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu Pro  
 660 665 670  
 Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His Ala  
 675 680 685  
 Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Glu  
 690 695 700  
 Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro Glu  
 705 710 715 720  
 Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu Glu  
 725 730 735  
 Ser Gly Met Trp Glu Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Pro Ala Pro  
 740 745 750  
 Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu Gln  
 755 760 765  
 Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser Gln  
 770 775 780  
 Pro Phe Ser Leu Glu Glu Gln Glu Gln Ile Leu Ser Cys Leu Ser Ile  
 785 790 795 800  
 Asp Ser Leu Ser Leu Ser Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys Ala  
 805 810 815  
 Ser Gln Ser Ser Arg Asp Thr Leu Ser Ser Gly Val His Ser Trp Ser  
 820 825 830

# ES 2 437 065 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>

<221> fuente

<223> /Nota=«Descripción de secuencia artificial: polipéptido recombinante que corresponde a los a.a. 401-681 de la secuencia de NIK de humano»

10 <400> 22

ES 2 437 065 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  
 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 da a conocer una porción específica de la secuencia aminoacídica.

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación que comprende anticuerpos policlonales y/o fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> de los mismos, en donde los anticuerpos se generan contra un péptido que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID n.º 12.
2. Preparación de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de IgG.
3. Preparación de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de origen murino.
4. Preparación de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, capaz de detectar específicamente la NIK mediante:
  - (a) análisis de inmunotransferencia Western;
  - (b) ELISA; o
  - (c) inmunoprecipitación.
5. Preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los anticuerpos se preparan mediante la inmunización de un mamífero no humano con un péptido que consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 12.
6. Preparación de acuerdo con la reivindicación 5, capaz de detectar la NIK murina.
7. Preparación de acuerdo con la reivindicación 5, preparada mediante la inmunización de un roedor.
8. Método para preparar un anticuerpo monoclonal anti-NIK que comprende la inmunización de un mamífero no humano con un péptido, que es parte de una secuencia aminoacídica de la NIK, y que es la SEQ ID n.º 12.
9. Anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma Pep 12-629-62-18, depositado en el CNCM con el n.º I-3094.
10. Clon de hibridoma depositado en el CNCM con el n.º I-3094.
11. Composición de materia que comprende un sustrato unido covalentemente a un polipéptido que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID n.º 12, capaz de capturar selectivamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente a la SEQ ID n.º 12.
12. Composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho sustrato es una matriz de cromatografía de afinidad.
13. Composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde dicho sustrato comprende un glúcido o un derivado de dicho glúcido.
14. Composición de materia de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho glúcido se selecciona del grupo que consiste en agarosa, sefarosa y celulosa.
15. Composición de materia de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en una perla, una resina o una superficie plástica.
16. Procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal anti-NIK, que comprende hacer crecer un hibridoma clonado que comprende hacer crecer el clon de hibridoma Pep12-629-62-18, depositado en el CNCM con el n.º I-3094, en medio líquido o en abdomen de mamífero para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal.
17. Procedimiento *in vitro* para la purificación de una proteína de fijación a NIK, que comprende poner en contacto una muestra que contiene la NIK y la proteína de fijación a la NIK con una preparación de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, que coimmunoprecipita la NIK y la proteína de fijación a NIK, lavar el complejo inmunitario producido, y recuperar la proteína fijada a la NIK a partir del complejo inmunitario utilizando un péptido competidor procedente de NIK.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la muestra se selecciona de líquidos corporales, extractos celulares y genotecas de expresión de ADN.
19. Uso de una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para el desarrollo de un ensayo de ELISA.
20. Uso de una preparación de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un

anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para la purificación inmunitaria de la NIK.

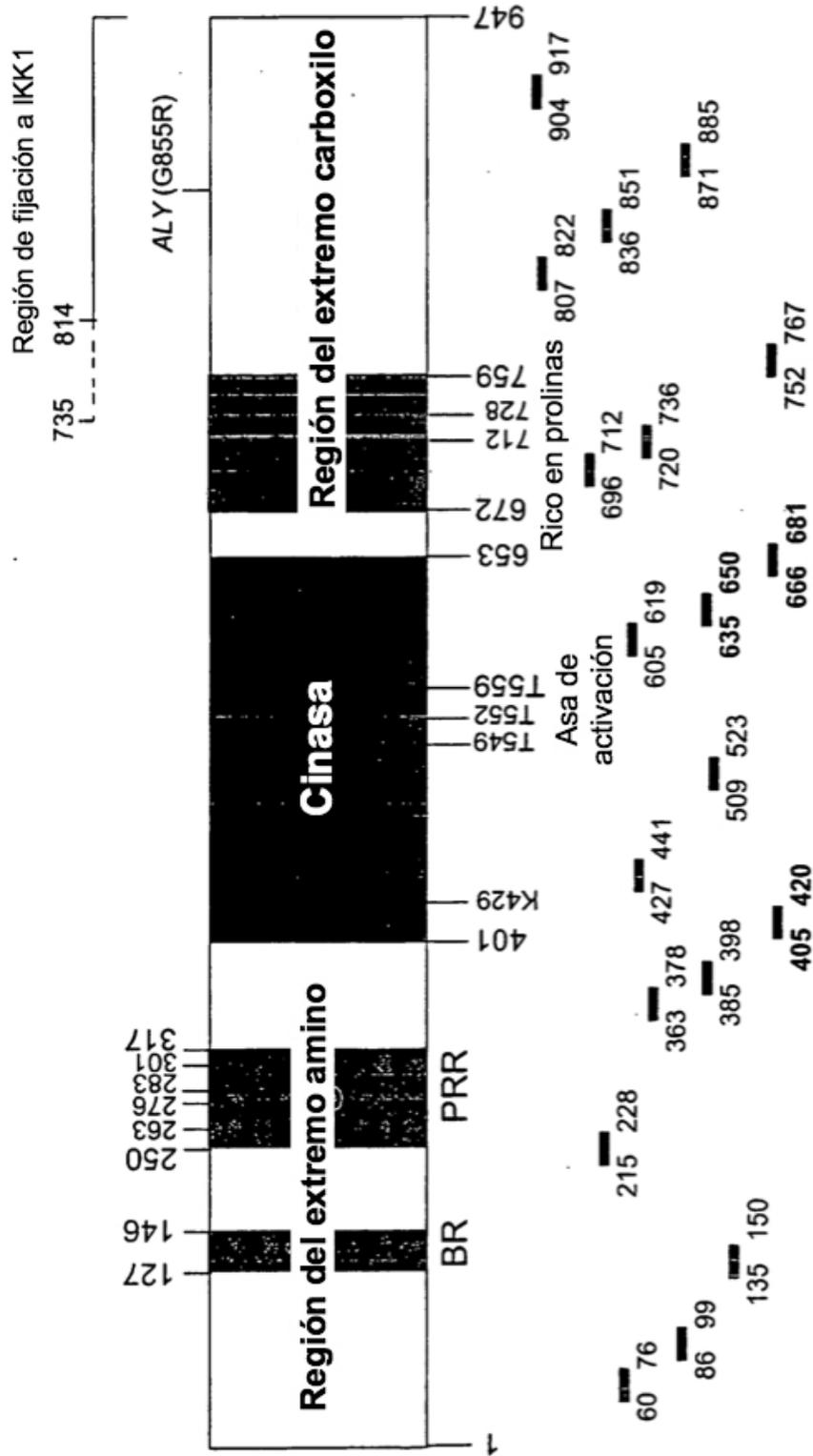


Figura 2

1	MAVMEMACPG	APGSAVGQOK	ELPKPKEKTP	PLGKKQSSVY	KLEAVEKSPV	50
51	FCGKWEILND	VITKGTAKEG	SEAGPAAISI	IAQAECENSQ	EFSPFTSERI	100
101	FIAGSKQYSQ	SESLDQIPNN	VAHATEGKMA	RVCWKGKRRS	KARKKRKKKS	150
151	SKSLAHAGVA	LAKPLPRTPE	QESCTIPVQE	DESPLGAPYV	RNTPQFTKPL	200
201	KEPGLGQLCF	KQLGEGLRPA	LPRSELHKLI	SPLQCLNHVW	KLHHPQDGGP	250
251	LPLPTHFPFY	SRLPHFPFFH	PLQPWKPHPL	ESFLGKLACV	DSQKPLPDPH	300
301	LSKLACVDSP	KPLPGPHLEP	SCLSRGAHEK	FSVEEYLVHA	LOGSVSSSQ	350
351	HSLTSLAKTW	AARGSRREP	SPKTEDNEGV	LLTEKLPVD	YEYREEVHWA	400
401	THQLRLGRGS	FGEVHRMEDK	QTGFQCAVKK	VRLEVFRAEE	LMACAGLTSP	450
451	RIVPLYGAVR	EGPWVNIFME	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	VNRALQQVGG	LKSPWRGEYK	EPRHPPNQA	NYHQLHAQP	RELSPRAPGP	700
701	RPAEETTGRA	PKLQPLPPE	PPEPNKSPPL	TLSKEESGMW	EPLPLSSLEP	750
751	APARNPSSPE	RKATVPEQEL	QQLEIELFLN	SLSQPFSL	QEQILSCLSI	800
801	DSLSDDDSE	KNPSKASQSS	RDTLSSGVHS	WSSQAEARSS	SWNMVLARGR	850
851	PTDTPSYFNG	VKVQIQSLNG	EHLHIREFHR	VKVGDIATGI	SSQIPAAAFS	900
901	LVTKDGQPVR	YDMEVPDSGI	DLQCTLAPDG	SFAWSWRVKH	GQLENRP	947

Figura 3

**Péptido procedente de NIK utilizado para la inmunización**

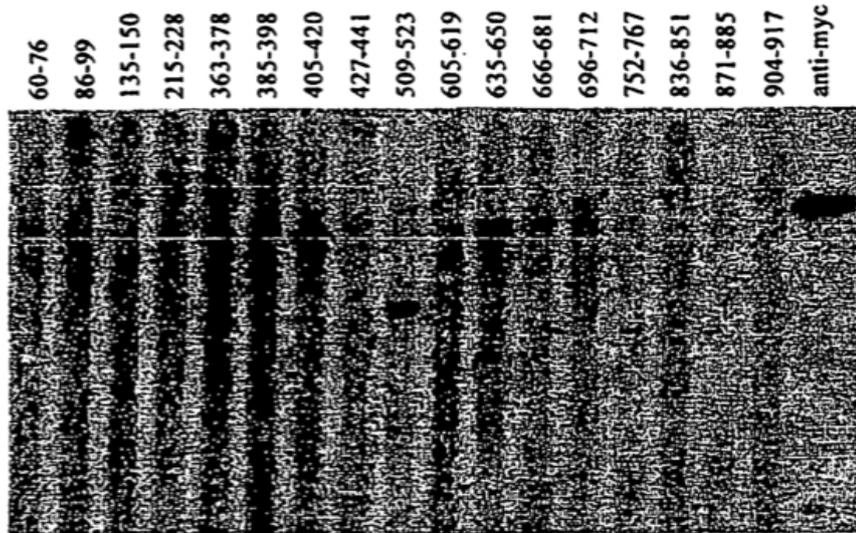
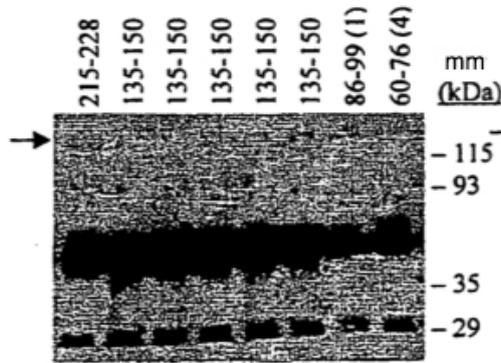
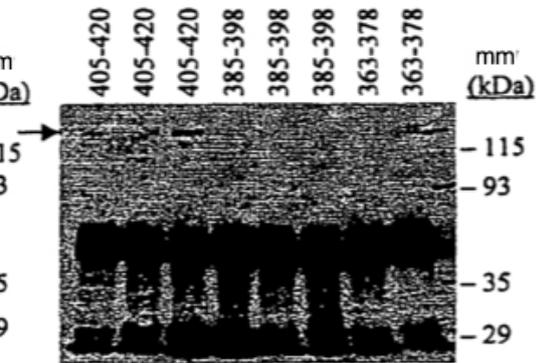


Figura 4

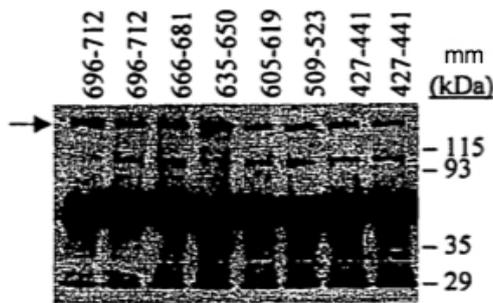
**Fig. 4a**



**Fig. 4b**



**Fig. 4c**



**Fig. 4d**

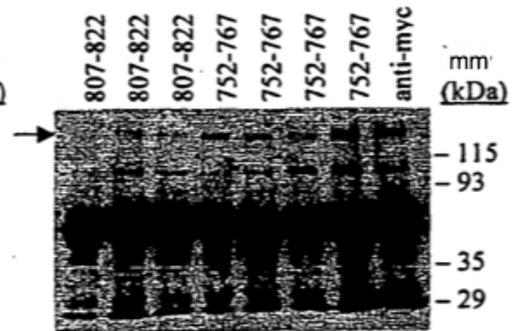


Fig. 5

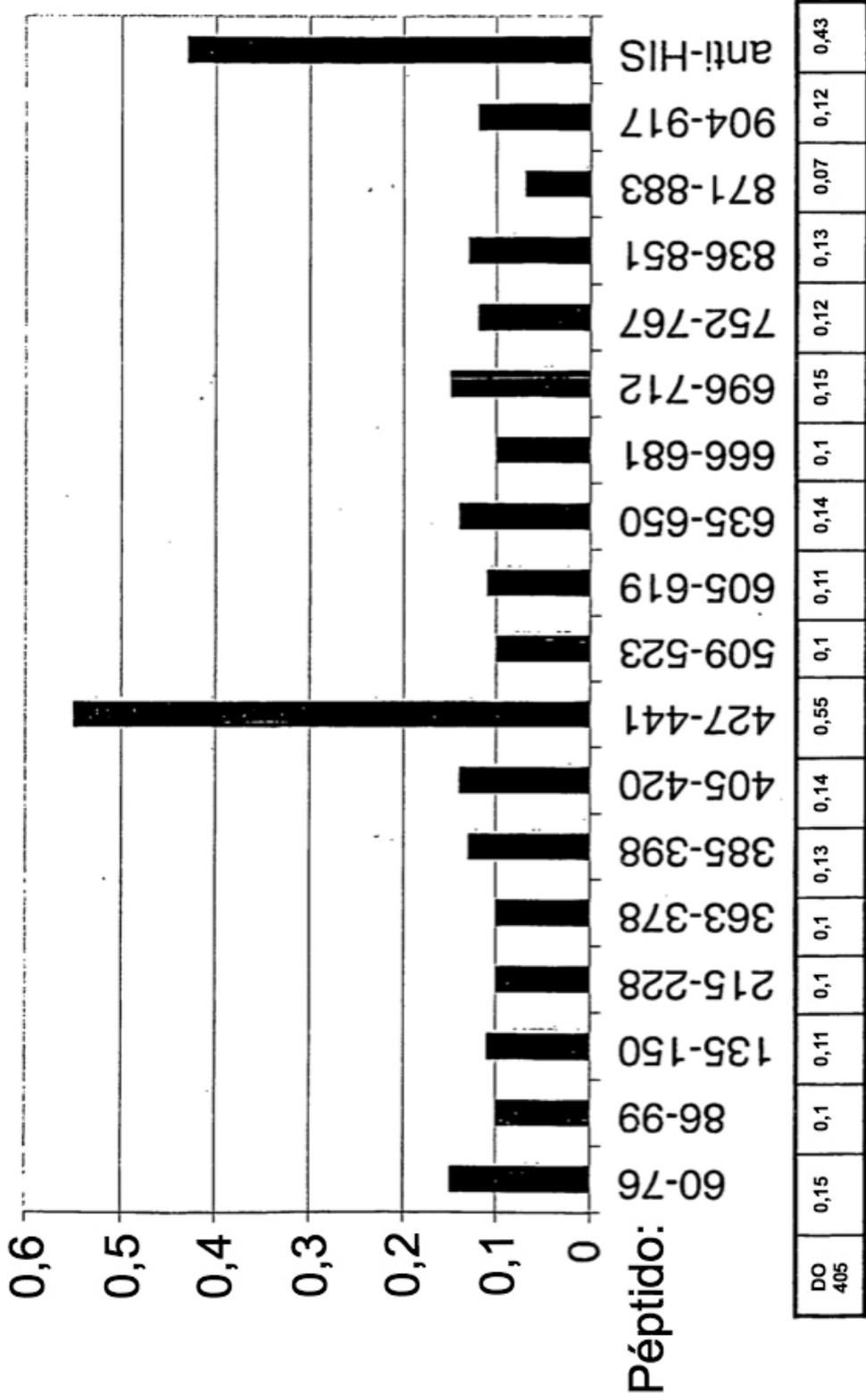


Figura 6

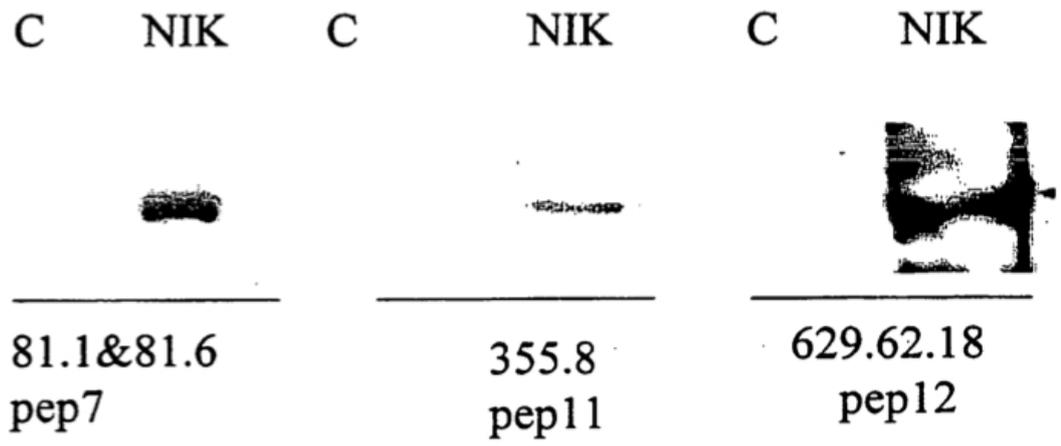


Figura 7

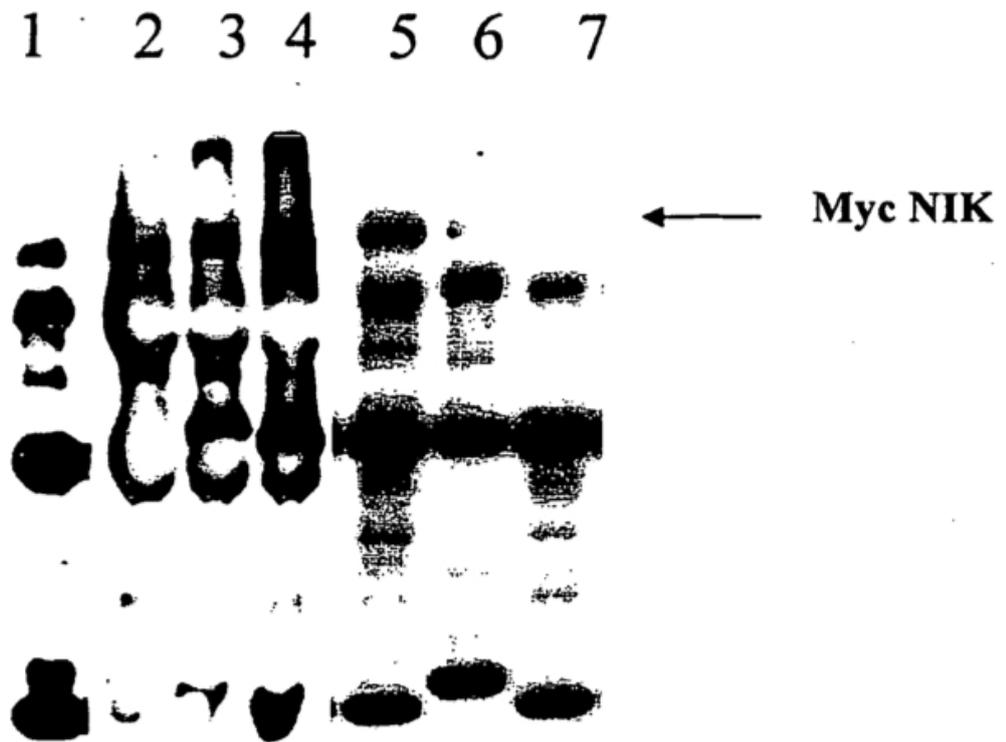


Figura 8

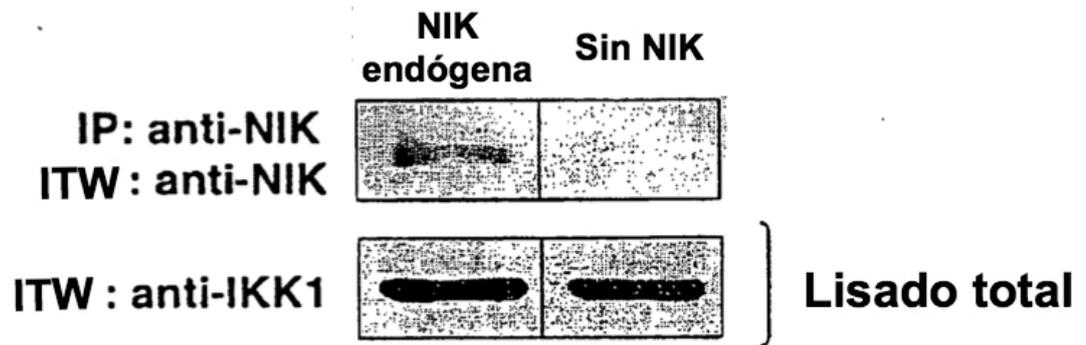


Figura 9

