

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 129**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2005 E 05807990 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1817344**

54 Título: **Anticuerpos anti-TNF alfa que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF alfa por medio del p55R**

30 Prioridad:

25.11.2004 GB 0425972

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**BROWN, DEREK THOMAS;
KIRBY, HISHANI;
FINNEY, HELENE MARGARET y
LAWSON, ALASTAIR DAVID GRIFFITHS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 129 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-TNF alfa que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF alfa por medio del p55R

La presente invención se refiere a anticuerpos hacia TNF α . En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al receptor p55.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina pro-inflamatoria que es liberada por e interacciona con las células del sistema inmunitario. Se ha demostrado que TNF α está aumentado en varias enfermedades humanas, que incluyen enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple.

El TNF- α humano es una proteína de 17 kDa, y la forma activa existe como un homotrímero (Pennica et al., 1984, Nature, 312, 724-729; Davis et al., 1987, Biochemistry, 26, 1322-1326; Jones et al., 1989, Nature, 338, 225-228). TNF α ejerce sus efectos biológicos por medio de la interacción con dos receptores de la superficie celular estructuralmente relacionados pero funcionalmente diferentes, p55R y p75R, que se co-expresan en la mayoría de tipos celulares (Loetscher et al., 1990, Cell, 61, 351; Smith et al., 1990, Science, 248, 1019). El p55R también se conoce como p55TNFR; CD120a; TNFR I; TNFR 1 y TNFRSF1a. El p75R también se conoce como p75TNFR; CD120b; TNFR II; TNFR 2 y TNFRSF1b. Ambos receptores también se liberan de manera proteolítica en forma de moléculas solubles capaces de unirse a TNF α . Los dominios extracelulares de los dos receptores exhiben similitud de secuencias, que consiste en cuatro motivos ricos en cisteína repetitivos que contienen de cuatro a seis cisteínas en posiciones conservadas. En contraste, sus secuencias de las regiones de señalización citoplasmáticas no están relacionadas, lo que sugiere diferentes modos de señalización y función.

Los diferentes papeles de los dos receptores se demostraron mediante la generación de ratones genéticamente deficientes de uno o ambos receptores (Peschon et al., 1998, J. Immunol., 160, 943-952). Este estudio demostró que el p55R es responsable de la mayoría de respuestas inflamatorias mediadas por TNF α , y que el p75R puede actuar en ciertas circunstancias para inhibir las respuestas inflamatorias mediadas por TNF α , y que los dos receptores pueden actuar como un sistema equilibrador de la acción de TNF α .

La inhibición de la actividad de TNF α como método para tratar una enfermedad, en particular, la artritis reumatoide, se ha conseguido mediante diferentes medios con el uso de inhibidores tales como anticuerpos y receptores solubles. Los ejemplos incluyen etanercept, comercializado por Immunex Corporation como Enbrel[™], que es una proteína de fusión recombinante que comprende dos dominios de receptores p75 de TNF solubles unidos a la porción Fc de una inmunoglobulina humana. Infliximab, comercializado por Centocor Corporation como Remicade[™], es un anticuerpo quimérico que tiene dominios variables anti-TNF α murinos y dominios constantes de IgG 1 humana. Adalimumab, comercializado por Abbott Laboratories como Humira[™], es un anticuerpo anti-TNF α completamente humano, recombinante (Tussiot y Wendling, 2004, Expert Opin. Pharmacother., 5, 581-594). Otros inhibidores incluyen moléculas de TNF α modificadas que forman trímeros con TNF α nativo y que impiden la unión al receptor (Steed et al., 2003, Science, 301, 1895-1898; documento WO03033720; documento WO0164889). Sandborn et al. 2002 Biologic Therapy of IBD Gastroenterology 122:1592-1608 describe el anticuerpo anti-TNF alfa CDP571 en el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Estos métodos actuales para inhibir la actividad de TNF α bloquean la unión de TNF α a los receptores p55 y p75 (véase, por ejemplo, Mease, 2005, Expert Opin. Biol. Therapy, 5, 11, 1491-1504). De manera interesante, se ha demostrado que Lenercept e Infliximab exacerbaban la esclerosis múltiple, lo que sugiere que también existe un papel beneficioso para TNF α en EM (Wiendl y Hohlfeld, 2002, Biodrugs, 16, 183-200). Actualmente se cree que, aunque la señalización de TNF α por medio del p55R es necesaria para los efectos perjudiciales de TNF α durante la fase aguda de EM, la señalización de TNF α por medio del p75R puede conducir a efectos beneficiosos, tales como la eliminación de infiltrados inflamatorios. Este papel inmunosupresor de TNF α también se ha propuesto en otras enfermedades autoinmunitarias (Cope, 1998, Current Opinion in Immunology, 10, 669-676). De hecho, se ha propuesto que se podrían usar agonistas de p75R para tratar afecciones alérgicas, tales como el asma bronquial alérgica (documento WO99/59632).

No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual los dos receptores se unen a TNF α , pero un informe sugiere que ambos receptores de TNF α se unen a TNF α mediante el uso de sitios de interacción similares (Banner et al., 1993, Cell, 73, 431-445). Varios estudios que usaron mutaciones puntuales en el polipéptido de TNF α han demostrado que ciertas áreas pequeñas de bucles superficiales localizados en la parte final de la subunidad son las más relevantes funcionalmente. En el trímero, estas áreas están una frente a la otra a través de la hendidura superficial entre dos subunidades. Esto sugiere que un receptor interacciona con los sitios de dos subunidades adyacentes, y que el trímero de TNF α tiene tres sitios de unión al receptor espacialmente diferentes pero equivalentes. No se cree que sea posible que ambos receptores se puedan unir al mismo trímero al mismo tiempo (Barbara et al., 1994, EMBO, 13, 843-850).

Sin embargo, ha sido posible crear mutantes de TNF α que se unen de manera selectiva al receptor p75 o p55. Se ha demostrado que los mutantes de TNF α que no se unen al p55R pero que sí se unen al p75R conservan la actividad

antitumoral, pero exhiben actividades proinflamatorias reducidas (Barbara et al., 1994, EMBO J, 13, 843-850). Esto ha llevado a que estos mutantes de TNF α selectivos de p75R se investiguen para el uso en terapias antineoplásicas para evitar la toxicidad sistémica que se observa con el TNF α nativo (Burruss Welborn III, et al., 1996, J. Exp. Med, 184, 165-171; documento US 5.606.023; documento EP0486908; documento EP0619372; documento EP0563714).

- 5 Sería deseable, para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunitarias, tales como EM, y ciertas enfermedades inflamatorias, poder inhibir de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, a la vez que se deja prácticamente inalterada la señalización de TNF α por medio del p75R.

La inhibición selectiva de la señalización por medio del p55R se podría conseguir mediante el uso de un anticuerpo específico del receptor p55. Hasta la fecha, solamente se han aislado anticuerpos selectivos hacia los receptores p55 y p75 murinos (Sheehan et al., 1995, J. Exp. Med. 181, 607-617). Sin embargo, existen desventajas potenciales asociadas al uso de anticuerpos anti-receptores, ya que estos también se pueden unir a formas solubles de los receptores, lo que reduce la eficacia de los anticuerpos, y se pierde el efecto protector de los receptores solubles. Además, también existe el riesgo de que los anticuerpos pudieran provocar ellos mismos la señalización una vez unidos al receptor, es decir, ser agonistas. También, debido a que el p55R se halla en la mayoría de tipos celulares del organismo, aunque a niveles bajos, pueden ser necesarias grandes dosis de anticuerpos para llevar a cabo un bloqueo suficiente de la señalización de p55R. Por lo tanto, puede ser mejor bloquear de manera selectiva la señalización del ligando menos abundante, TNF α por medio del p55R, por ejemplo bloqueando la unión al p55R. Hasta la fecha, no ha habido informes de anticuerpos anti-TNF α que inhiban de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R a la vez que se conserva la señalización de TNF α por medio del p75R.

20 Sorprendentemente, a pesar de que los receptores p55 y p75 comparten aparentemente el mismo sitio de unión en el trímero de TNF α , se ha podido demostrar que es posible aislar un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al p55R. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R reduciendo la señalización a través suyo respecto del p75R, inhibiendo la señalización de TNF α por medio del p55R en un grado mayor que la inhibición de la señalización de TNF α por medio del p75R, en el que el anticuerpo tiene una CI_{50} para la señalización de TNF α por medio de p55R que es al menos 5 veces inferior a su CI_{50} para la señalización de TNF α por medio de p75R, para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La presente invención proporciona además un anticuerpo anti-TNF α que comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 o SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3, en el que el anticuerpo tiene una CI_{50} para la señalización de TNF α por medio de p55R que es al menos 5 veces inferior a su CI_{50} para la señalización de TNF α por medio de p75R. El anticuerpo anti-TNF α de la presente invención inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R. Los anticuerpos de la presente invención, por lo tanto, tienen la propiedad ventajosa de que pueden inhibir de manera selectiva los efectos de TNF α mediados por el p55R a la vez que se conservan los efectos beneficiosos de la señalización de TNF α por medio del p75R. Por lo tanto, la presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. También se proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R.

Los residuos de los dominios variables de un anticuerpo se numeran convenientemente según un sistema diseñado por Kabat et al. Este sistema se establece en Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., NIH, EE.UU. (a partir de ahora, "Kabat *et al.* (anteriormente mencionado)"). En la presente especificación se usa dicho sistema de numeración, a menos que se indique lo contrario.

Las designaciones de residuos de Kabat siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácido. La secuencia de aminoácidos lineal en cuestión puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales respecto a la numeración Kabat estricta, que corresponden a un acortamiento, inserción en un componente estructural, tanto estructura básica como región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura de dominio variable básica. Para un anticuerpo dado se puede determinar la numeración Kabat de residuos correcta a través del alineamiento de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

Las CDRs del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el lazo equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Por tanto, 'CDR-H1', tal como se usa en la presente memoria, comprende los

residuos 26 a 35, descritos mediante una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición de lazo topológica de Chothia.

Las CDRs del dominio de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración Kabat.

- 5 Los anticuerpos anti-TNF α de la presente invención se unen de manera selectiva a TNF α . La unión selectiva significa que los anticuerpos tienen una afinidad mayor hacia los polipéptidos de TNF α que hacia otros polipéptidos. Preferiblemente, el polipéptido de TNF α es TNF α humano.

10 El polipéptido de TNF α o las células que expresan dicho polipéptido se pueden usar para producir anticuerpos anti-TNF α que reconocen de manera específica dicho polipéptido. El polipéptido de TNF α puede ser un polipéptido 'maduro' o un fragmento biológicamente activo o derivados del mismo que incluyen el sitio de unión al receptor. Preferiblemente, el polipéptido de TNF α es el polipéptido maduro. Los polipéptidos de TNF α se pueden preparar mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedantes modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión, o se pueden recuperar de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Éstos se usan de manera indistinta a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido de TNF α en algunos casos puede formar parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo fusionado a una etiqueta de afinidad. Se pueden obtener anticuerpos generados contra estos polipéptidos, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos rutinarios bien conocidos, véase por ejemplo "Handbook of Experimental Immunology", D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tal como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos. Sin embargo, generalmente se prefieren los ratones, los conejos, los cerdos y las ratas.

25 Los anticuerpos anti-TNF α para el uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos o derivados funcionalmente activos de los mismos y pueden ser, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. Los fragmentos de anticuerpos particulares también incluyen los descritos en las solicitudes de patentes internacionales WO2005003169, WO02005003170 y WO2005003171 (todas publicadas el 13 de enero de 2005). Los fragmentos de anticuerpo y los métodos para producirlos son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181;

35 Los anticuerpos para uso en la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

40 Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si los hay, pueden seleccionarse en relación a la función propuesta para la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden usar los dominios de región constante de IgG humana, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras. De manera alternativa, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se destina a propósitos terapéuticos y no son necesarias las funciones efectoras del anticuerpo. También se pueden usar variantes de estos dominios de región constante. Por ejemplo, las moléculas de IgG en las que la serina de la posición 241 se ha cambiado por prolina se describen en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. El dominio constante de IgG4 que comprende dicho cambio es particularmente preferido.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse empleando cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4: 72) y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pág. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

50 Los anticuerpos para uso en la invención también pueden ser generados usando métodos de anticuerpo de linfocito sencillo mediante clonación y expresión de ADNcs de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos sencillos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377.

55 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de especies no humanas y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p.ej. la Patente de EE.UU. n.º 5.585.089; y la Solicitud de Patente Internacional WO91/09967).

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido modificados genéticamente de tal modo que los genes de cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Estos anticuerpos quiméricos probablemente son menos antigénicos. Se pueden preparar anticuerpos bivalentes empleando métodos conocidos en la técnica (Milstein et al., 1983, Nature 305: 537-539; WO 93/08829, Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10: 3655-3659). Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, el documento WO 92/22853).

Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse mediante diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica y que incluyen los descritos por Brinkman et al. (en J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184: 177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24: 952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187: 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57: 191-280) y las solicitudes internacionales de patente WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. 5.698.426; 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. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple, tales como las descritas en el documento US 4.946.778 también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple hacia el polipéptido de TNF α . Asimismo, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos transgénicos, que incluyen a otros mamíferos transgénicos, para expresar anticuerpos humanizados.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, que comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 o SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3.

En un ejemplo, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada en la que al menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada se seleccionan de lo siguiente: la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 o SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 y CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10. De manera alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:21 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11.

En una realización, un anticuerpo según la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3.

En una realización, un anticuerpo según la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20.

En otra realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6 o la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20. En una realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6 o la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20.

"Identidad", tal como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", tal como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, leucina se puede sustituir por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que se pueden sustituir a menudo entre sí incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);

- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

5 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, que comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3.

15 En una realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en la que al menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan de lo siguiente: la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 y CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13. De manera alternativa, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14, o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14.

En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3.

25 En una realización, la presente invención comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

30 En otra realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden preferiblemente una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

35 En una realización, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 o SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3.

40 En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6, y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

45 En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20, y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

50 En una realización adicional de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en las que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:6, y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

55 En una realización adicional de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en las que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad

o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20, y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 98% de identidad o similitud respecto de la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.

Un anticuerpo proporcionado por la presente invención se denomina en la presente memoria anticuerpo '462'. Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata '462' se proporcionan en SEQ ID N°s: 5 y 6, y las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata '462' se proporcionan en SEQ ID N°s: 7 y 8. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de este anticuerpo que incluyen la secuencia líder de rata se proporcionan en SEQ ID N°s: 1 y 2, y las regiones variables de la cadena ligera se proporcionan en SEQ ID N°s:3 y 4.

Otro anticuerpo proporcionado por la presente invención se denomina en la presente memoria anticuerpo '463'. Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata '463' se proporcionan en SEQ ID N°s: 19 y 20, y las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata '463' se proporcionan en SEQ ID N°s: 7 y 8. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de este anticuerpo que incluyen la secuencia líder de rata se proporcionan en SEQ ID N°s: 15 y 16 y las regiones variables de la cadena ligera se proporcionan en SEQ ID N°s: 17 y 18.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-TNF α con injerto de CDRs (o humanizado), caracterizado porque el anticuerpo inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R. En una realización, una o más de las CDRs de la molécula de anticuerpo con injerto de CDRs se han obtenido de los anticuerpos de rata 462 ó 463. Las CDRs del anticuerpo de rata 462 se proporcionan en SEQ ID N°s:9, 10, 11, 12, 13 y 14. Las CDRs del anticuerpo de rata 463 se proporcionan en SEQ ID N°s:9, 21, 11, 12, 13 y 14. Tal como se usa en la presente memoria, el término 'molécula de anticuerpo con injerto de CDRs' se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (que incluyen, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (p.ej., un anticuerpo de rata tal como el anticuerpo '462' o '463' como se describe en la presente memoria) injertadas en una región estructural de una región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p.ej., un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

Cuando se injertan las CDRs, se puede usar cualquier secuencia estructural de la región variable aceptora adecuada teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del que proceden las CDRs, que incluyen regiones estructurales de ratón, primate y humanas. Preferiblemente, el anticuerpo con injerto de CDRs de la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales aceptoras humanas así como una o más de las CDRs procedentes del anticuerpo donante mencionado anteriormente. Así, se proporciona un anticuerpo con injerto de CDRs en el que el dominio variable comprende regiones estructurales aceptoras humanas y no humanas, preferiblemente CDRs donantes de rata.

Los ejemplos de regiones estructurales humanas que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, anteriormente mencionado). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. De manera alternativa, se pueden usar secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo con injerto de CDRs de la presente invención, no es necesario que las cadenas pesadas y ligeras aceptoras procedan del mismo anticuerpo, y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tengan regiones estructurales procedentes de cadenas diferentes.

También, en un anticuerpo con injerto de CDRs de la presente invención, no es necesario que las regiones estructurales tengan exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos poco frecuentes se pueden cambiar por residuos que se dan con más frecuencia para esa clase o tipo de cadena aceptora. De manera alternativa, se pueden cambiar residuos seleccionados de las regiones estructurales aceptoras de forma que correspondan al residuo hallado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Tales cambios se deberían mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Se expone un protocolo para seleccionar los residuos de las regiones estructurales aceptoras que puede ser necesario cambiar en el documento WO 91/09967.

Los residuos donantes son residuos del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del que procedieron en un principio las CDRs, que en una realización de la presente invención pueden ser de los anticuerpos de rata '462' o '463', como se describe en la presente memoria.

La molécula de anticuerpo de cualquier aspecto de la presente invención tiene preferiblemente una afinidad de unión elevada hacia TNF α , preferiblemente picomolar. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de entre alrededor de 1 y 500 pM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de entre alrededor de 10 y alrededor de 400 pM. Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica. Cuando sea necesario, se puede mejorar la afinidad del anticuerpo para el uso en la presente invención mediante el uso de protocolos de maduración de afinidad conocidos en la técnica, tales como mutar las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reordenamiento aleatorio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reordenamiento aleatorio de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), expresión en fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (anteriormente mencionado) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Los anticuerpos anti-TNF α proporcionados por la presente invención inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al p55R, es decir, reducen la señalización por medio de este receptor. La expresión 'inhibir de manera selectiva' significa que los anticuerpos de la presente invención inhiben la señalización de TNF α por medio del p55R en un grado mayor que la inhibición de la señalización de TNF α por medio del p75R. La invención proporciona un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R. Preferiblemente, el anticuerpo reduce sustancialmente la señalización de TNF α por medio del p55R. En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención reduce sustancialmente la unión de TNF α al p55R. En un ejemplo, los anticuerpos de la presente invención inhiben la unión de TNF α al p55R en mayor medida que la unión de TNF α al p75R. Se entenderá que el término 'inhibir', tal como se usa en la presente memoria, incluye la inhibición total y parcial. Por lo tanto, el término incluye la inhibición total y parcial de la señalización de TNF α por medio del p55R. Se apreciará que el grado de inhibición se puede ver afectado por la concentración de anticuerpo usado.

En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R más de un 40%, preferiblemente entre un 40 y 100%, aún más preferiblemente entre un 45 y 100%. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 50% o más. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 60% o más. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 70% o más. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 80% o más. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 90% o más.

En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la unión de TNF α al p55R en más de un 40%, preferiblemente entre un 40 y 100%, aún más preferiblemente entre un 45 y 100%.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención deja prácticamente inalterada la señalización de TNF α por medio del p75R. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la señalización de TNF α por medio del p75R como máximo alrededor de un 50%, preferiblemente entre un 0 y 50%. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la señalización de TNF α por medio del p75R como máximo alrededor de un 40%. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la señalización de TNF α por medio del p75R como máximo alrededor de un 30%. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la señalización de TNF α por medio del p75R como máximo alrededor de un 20%. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la señalización de TNF α por medio del p75R como máximo alrededor de un 10%.

En un ejemplo, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención deja prácticamente inalterada la unión de TNF α al p75R. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención reduce la unión de TNF α al p75R como máximo alrededor de un 30%, preferiblemente entre un 0 y 30%, más preferiblemente entre un 0 y 20%, aún más preferiblemente entre un 0 y 15%.

Por lo tanto, en un ejemplo, a la concentración a la que un anticuerpo anti-TNF α de la presente invención inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R un 50%, la señalización de TNF α por medio del p75R se reduce como máximo un 40%, en general como máximo un 30%, normalmente como máximo un 25%, en general como máximo un 20%, de manera ideal como máximo un 10%.

En la presente invención, la concentración de anticuerpo necesaria para inhibir la señalización de TNF α un 50% se indica como la CI₅₀. Por lo tanto, en la presente invención, el anticuerpo anti-TNF α de la presente invención tiene una CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio del p55R que es al menos 5 veces inferior, en general al menos 10 veces inferior, en general al menos 15 veces inferior, normalmente al menos 20 veces inferior, de manera ideal al menos 50 veces inferior, preferiblemente al menos 100 veces inferior a su CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio del p75R. La persona experta apreciará que un valor de CI₅₀ inferior indica un compuesto *más activo*.

Para identificar los anticuerpos anti-TNF α que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo la unión de TNF α al p55R, los expertos en la técnica pueden utilizar varias aproximaciones diferentes. En un ejemplo, se identifican los anticuerpos con estas propiedades identificando primero

los anticuerpos que interactúan con TNF α y posteriormente ensayando esos anticuerpos para identificar aquellos que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R. En otro ejemplo, los anticuerpos se identifican identificando primero los anticuerpos que interactúan con TNF α y posteriormente ensayando esos anticuerpos para identificar los que inhiben de manera selectiva la unión de TNF α al p55R y opcionalmente cribando además esos anticuerpos en función de la inhibición selectiva de la señalización. De manera alternativa, se pueden cribar directamente los anticuerpos para identificar los que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R, por ejemplo cribando directamente en ensayos de señalización y/o unión.

Los anticuerpos que interactúan con TNF α se pueden identificar mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo mediante el uso de un sistema de ensayo en el que el polipéptido de TNF α se pone en contacto con un anticuerpo candidato y se determina la capacidad del anticuerpo candidato de interactuar con el polipéptido de TNF α . Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo candidato de interactuar con un polipéptido de TNF α se compara con un intervalo de referencia o control. Si se desea, este ensayo se puede usar para cribar una diversidad de anticuerpos candidatos mediante el uso de una diversidad de muestras de polipéptidos de TNF α . En un ejemplo, una primera y segunda muestra que comprende un polipéptido de TNF α nativo o recombinante se ponen en contacto con un anticuerpo candidato o un agente de control, y se determina la capacidad del anticuerpo candidato de interactuar con el polipéptido de TNF α comparando la diferencia de la interacción entre el anticuerpo candidato y el agente de control. Preferiblemente, el polipéptido de TNF α se inmoviliza primero, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que reconoce y se une de manera específica a él, o poniendo en contacto una preparación purificada de polipéptido de TNF α con una superficie diseñada para unir proteínas. El polipéptido de TNF α puede ser parcialmente o completamente purificado (p.ej. parcialmente o completamente exento de otros polipéptidos) o parte de un lisado celular. Además, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido de TNF α o una porción biológicamente activa del mismo y un dominio tal como glutatión-S-transferasa o la región Fc de IgG1. De manera alternativa, el polipéptido se puede biotilinar mediante el uso de métodos bien conocidos para los expertos en la técnica (p.ej. equipo de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). En ciertos casos, el polipéptido de TNF α o el anticuerpo candidato se marca, por ejemplo, con un marcador radiactivo (tal como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para posibilitar la detección de una interacción entre el polipéptido de TNF α y un anticuerpo candidato. La capacidad del anticuerpo candidato de interactuar con el polipéptido de TNF α se puede determinar mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorescente (FMAT).

Como se describió anteriormente, los anticuerpos se pueden pre-cribar para identificar los anticuerpos que se unen a TNF α antes de cribar los anticuerpos que se unen por su capacidad de inhibir de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R inhibiendo la unión de TNF α al p55R. Los anticuerpos que inhiben de manera selectiva la unión de TNF α al p55R se pueden identificar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo:

(i) comparando la unión de TNF α al p55R en presencia de un anticuerpo candidato con la unión de TNF α al p55R en ausencia del anticuerpo candidato o en presencia de un agente de control; y

(ii) comparando la unión de TNF α a p75R en presencia del anticuerpo candidato con la unión de TNF α al p75R en ausencia del anticuerpo candidato o en presencia de un agente de control; y

(iii) determinando si el anticuerpo candidato inhibe sustancialmente la unión de TNF α al p55R respecto del p75R.

Tales ensayos se pueden usar para cribar agentes candidatos en la monitorización clínica y/o en el desarrollo de fármacos.

Se han descrito ejemplos de ensayos de inhibición de la unión de receptores de TNF α adecuados (p55R y p75R), véase por ejemplo el documento US 5.606.023 y Loetscher et al., 1993, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 26350-26357. Los ejemplos adicionales de ensayos sin células y basados en células adecuados se proporcionan en los Ejemplos.

Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo candidato de inhibir de manera selectiva la unión de TNF α al p55R se compara respecto de un intervalo de referencia o control. Si se desea, se puede usar este ensayo para cribar una diversidad de anticuerpos candidatos mediante el uso de una diversidad de ensayos de inhibición de la unión al receptor. En un ejemplo de un ensayo sin células, una primera y segunda muestra que comprenden polipéptido de TNF α nativo o recombinante se ponen en contacto con un anticuerpo candidato o un agente de control, y se determina la capacidad del anticuerpo candidato de inhibir la unión del polipéptido de TNF α al p55R o p75R comparando la diferencia de la unión de TNF α a cada receptor en presencia del anticuerpo candidato y un agente de control. En un ejemplo de tal ensayo, el dominio extracelular del polipéptido receptor se inmoviliza primero, por ejemplo, poniendo en contacto el dominio extracelular del receptor adecuado con un anticuerpo inmovilizado que reconoce y se une de manera específica a él, o poniendo en contacto una preparación purificada del polipéptido

receptor con una superficie diseñada para unir proteínas. El polipéptido receptor puede ser parcialmente o completamente purificado (p.ej. parcialmente o completamente exento de otros polipéptidos) o parte de un lisado celular. Además, el polipéptido receptor puede ser una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del receptor o una porción biológicamente activa del mismo y un dominio tal como glutation-S-transferasa o la porción Fc de IgG1. De manera alternativa, el polipéptido receptor se puede biotinilar mediante el uso de métodos bien conocidos para los expertos en la técnica (p.ej. equipo de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del anticuerpo candidato de inhibir la unión de TNF α a los receptores p55 o p75 inmovilizados se puede determinar mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorescente (FMAT).

En otro ejemplo de un ensayo sin células, el polipéptido de TNF α se inmoviliza primero, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que reconoce y se une de manera específica a él, o poniendo en contacto una preparación purificada de polipéptido de TNF α con una superficie diseñada para unir proteínas. La capacidad de un anticuerpo candidato de inhibir de manera selectiva la unión de TNF α al p55R o p75R se puede determinar incubando el anticuerpo candidato con el polipéptido de TNF α inmovilizado, poniendo en contacto el polipéptido de TNF α con el polipéptido de p55R o p75R y detectando si el receptor se ha unido al polipéptido de TNF α . Los polipéptidos de p55R y p75R pueden ser cada uno una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del receptor o una porción biológicamente activa del mismo y un dominio tal como la porción Fc de IgG1. La unión del receptor se puede detectar mediante el uso, por ejemplo, de anticuerpos anti-Fc de IgG que se unen a la porción Fc de la proteína de fusión del receptor conjugada a un grupo indicador tal como peroxidasa. La presencia o ausencia de unión del receptor se puede usar para determinar si el anticuerpo candidato ha bloqueado de manera selectiva la unión de TNF α al p55R.

En otro ejemplo, en el que se usa un ensayo basado en células, una población de células que expresan el p55R o p75R se pone en contacto con TNF α y un anticuerpo candidato, y se determina la capacidad del anticuerpo candidato de inhibir la unión de TNF α al receptor. Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo candidato de inhibir la unión de TNF α se compara con un intervalo de referencia o control. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariótico (p.ej., de levadura o mamífero) y puede expresar el p55R o p75R de manera endógena, o estar modificada genéticamente para expresar el polipéptido. En ciertos casos, el polipéptido de TNF α se marca, por ejemplo, con un marcador radiactivo (tal como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para posibilitar la detección de una interacción entre el polipéptido de TNF α y el receptor. También se pueden usar métodos alternativos tales como ELISA, citometría de flujo y FMAT.

Los anticuerpos que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al p55R, se pueden identificar mediante el uso de ensayos de señalización basados en células.

En un ejemplo, se usan células L929 (una línea celular de fibroblastos de ratón) que expresan el p55R de ratón pero no el p75R para determinar si un anticuerpo candidato bloquea la señalización de TNF α por medio del p55R, p.ej. inhibiendo la unión al p55R. Estas células son destruidas por TNF α humano si se sensibilizan con un inhibidor de la síntesis de proteínas tal como actinomicina D, por lo tanto, por ejemplo, si un anticuerpo candidato bloquea la unión de TNF α al p55R, protege a las células de la citotoxicidad mediada por TNF α . Los anticuerpos bloqueantes se pueden detectar, por lo tanto, determinando la viabilidad celular al final del ensayo. El ensayo se describe con detalle en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria y en el documento WO92/11383.

De manera alternativa, la unión de TNF α a uno de sus receptores y la señalización del receptor resultante se puede detectar mediante el uso de un ensayo con gen indicador basado en células mediante el uso de genes indicadores tales como, por ejemplo, una luciferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, o proteína fluorescente verde unida a al menos la región extracelular (o una porción de unión de TNF α de la misma) de los receptores de TNF α p55 o p75 para detectar la expresión génica posterior tras la unión de TNF α . Los detalles de los ejemplos de tales ensayos se proporcionan en los Ejemplos. Una reducción de la expresión del gen indicador es indicativa de un anticuerpo candidato que bloquea la señalización de TNF α por medio del receptor, por ejemplo inhibiendo la unión al receptor.

Puede ser necesario cribar varios anticuerpos anti-TNF α diferentes de cualquier fuente adecuada mediante el uso de los métodos descritos anteriormente en la presente memoria para hallar uno que inhiba de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R. La presente invención, por lo tanto, proporciona un método para obtener un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la unión de TNF α al p55R que comprende:

a) obtener al menos un anticuerpo anti-TNF α

b) cribar el anticuerpo obtenido en la etapa (a) para determinar si el anticuerpo inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al p55R y, cuando sea necesario, repitiendo las etapas (a) y (b) hasta hallar al menos un anticuerpo selectivo.

Preferiblemente, el anticuerpo identificado en la etapa (b) del método inhibe de manera selectiva la unión de TNF α al

p55R más de un 45%, e inhibe la unión de TNF α al p75R como máximo un 30%.

En una realización preferida, los anticuerpos obtenidos en la etapa (a) del método se obtienen de un animal inmunizado, preferiblemente mediante el uso de los métodos descritos, por ejemplo, en Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; el documento WO92/02551; el documento WO2004/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377.

Los anticuerpos anti-TNF α que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo la unión de TNF α al p55R, se pueden identificar o ensayar adicionalmente, por ejemplo para determinar las cantidades terapéuticamente eficaces en uno o más modelos animales. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, monos, conejillos de indias, perros y gatos. Preferiblemente, el animal usado representa un modelo de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, tal como EM, diabetes, LES, artritis reumatoide, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia gravis, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, granulomatosis de Wegener, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante o enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

En un ejemplo, la inhibición selectiva de la señalización de TNF α por medio del p55R se puede determinar monitorizando una mejora de los síntomas de la enfermedad, un inicio retardado o una progresión lenta de la enfermedad, por ejemplo, pero sin limitación, una reducción del índice clínico. Se pueden usar técnicas conocidas para los médicos familiarizados con la enfermedad autoinmunitaria para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados a la enfermedad.

Se conocen varios modelos diferentes de enfermedad autoinmunitaria en la técnica, por ejemplo existen varios modelos de enfermedad para EM ('t Hart y Amor 2003, Current Opinion in Neurology 16:375-83). En particular, se considera que la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratones ABH es un modelo pertinente para EM en seres humanos (Baker et al., 1990. Journal of Neuroimmunology, 28:261-270). Se han desarrollado modelos agudos y de recaída-remisión.

La presente descripción también describe una región específica del polipéptido de TNF α en la que la unión de un anticuerpo a esa región inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo la unión de TNF α al p55R respecto del p75R. Esta región o epítipo específico del polipéptido de TNF α se puede identificar mediante cualquier método adecuado de cartografía de epítipos conocido en la técnica en combinación con el anticuerpo proporcionado por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen el cribado de péptidos de longitudes variables derivados de TNF α en función de la unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que pueda unirse de manera específica al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de TNF α se pueden producir de manera sintética o mediante digestión proteolítica del polipéptido de TNF α . Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar mediante análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede usar la espectroscopía de RMN para identificar el epítipo de la presente invención. Una vez identificado, se puede usar el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención, si es necesario, para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

La descripción describe además una región o epítipo específico de TNF α humano en el que la unión del anticuerpo '462' o '463' o de anticuerpos que comprenden una o más CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 a esa región inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R.

Los anticuerpos que bloquean de manera cruzada la unión de los anticuerpos de la presente invención a TNF α pueden ser útiles de forma similar para inhibir selectivamente la señalización de TNF α por medio del p55R. Por lo tanto, se describe un anticuerpo que tiene especificidad hacia TNF α humano, que bloquea de manera cruzada la unión del anticuerpo '462' o del anticuerpo '463' o cualquier anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 a TNF α humano, y/o que es bloqueado de manera cruzada en la unión a TNF α humano por cualquiera de esos anticuerpos. Tal anticuerpo se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo '462' o el anticuerpo '463' o cualquier anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21. El anticuerpo se puede unir a un epítipo que bordea y/o solapa con el epítipo que se une al anticuerpo '462' o al anticuerpo '463' o cualquier anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21. De manera alternativa, el anticuerpo no se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo '462' o el anticuerpo '463' o cualquier anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 o un epítipo que bordea y/o solapa con dicho epítipo.

Los anticuerpos con bloqueo cruzado se pueden identificar mediante el uso de cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo mediante el uso de ELISA competitivo o BIAcore, en el que la unión del anticuerpo con bloqueo cruzado a TNF α humano impide la unión del anticuerpo '462' o del anticuerpo '463' o cualquier anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N $^{\circ}$ s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 o viceversa.

Se describe además un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del

p55R, que bloquea de manera cruzada la unión del anticuerpo '462' o del anticuerpo '463' o un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 a TNF α humano. Los anticuerpos con bloqueo cruzado pueden inhibir la unión del anticuerpo '462' o del anticuerpo '463' o un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 a TNF α humano en un 80% o más.

De manera alternativa o además, los anticuerpos se pueden bloquear de manera cruzada en la unión a TNF α humano por cualquier anticuerpo '462' o anticuerpo '463' o un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21. También se describe, por lo tanto, un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R que se bloquea de manera cruzada en la unión a TNF α humano por el anticuerpo '462' o el anticuerpo '463' o un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21. Los anticuerpos con bloqueo cruzado se pueden inhibir en la unión a TNF α humano por el anticuerpo '462' o el anticuerpo '463' o un anticuerpo que comprende una o más de las CDRs proporcionadas en SEQ ID N°s 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 21 en un 80% o más.

Si se desea, un anticuerpo para el uso en la presente invención se puede conjugar a una molécula efectora. El término molécula efectora tal como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p.ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR. En un ejemplo, los anticuerpos anti-TNF α se pueden conjugar a una molécula efectora, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o un resto de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un resto de fármaco que puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales restos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p.ej., angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento.

En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células (p.ej. que las destruye). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, y los análogos u homólogos de los mismos. Las moléculas efectoras también incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (p.ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (p.ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p.ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Wolframio 188 /Renio 188 , o fármacos tales como, aunque sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo está fusionado por medio de un enlace covalente (p.ej. un enlace peptídico), opcionalmente en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma; preferiblemente, al menos una porción de 10, 20 ó 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento del mismo, está unido a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante del anticuerpo. Se pueden usar procedimientos de ADN recombinante para crear tales fusiones, por ejemplo como se describió en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

En otro ejemplo, la molécula efectora puede incrementar la semivida *in vivo*, y/o aumentar el transporte de un anticuerpo a través de una barrera epitelial hacia el sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina.

En un ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden estar unidos a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar unidas a

través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre de tipo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos se pueden dar de manera natural en el fragmento de anticuerpo o se pueden introducir en el fragmento mediante el uso de métodos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, el documento US 5.219.996. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Preferiblemente, las moléculas de PEG se unen covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos para tiol tales como maleimidas y los derivados de cisteína.

En otro ejemplo, el anticuerpo es un fragmento Fab' modificado que está PEGilado, es decir, que tiene un PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente, p.ej., según el método descrito en el documento EP 0948544 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545]. Preferiblemente, el PEG se une a una cisteína en la región de bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región de bisagra modificada. Se puede unir covalentemente un residuo de lisina a un grupo maleimida, y cada uno de los grupos amina del residuo de lisina se puede unir a un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tenga un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento de Fab' puede ser aproximadamente de 40.000 Da.

Los fragmentos de anticuerpos PEGilados particulares también incluyen los descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005003169, WO2005003170 y WO2005003171.

La presente descripción también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la cadena ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican para una parte o para la totalidad de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo pueden sintetizarse según se desee a partir de determinadas secuencias de ADN, o en base a las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN que codifica para secuencias estructuralesceptoras está ampliamente disponible para los especialistas en la técnica, y se puede sintetizar fácilmente en base a sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o parcialmente usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar técnicas de mutagénesis sito-dirigida y de reacción en cadena de polimerasa (PCR), según sea apropiado.

Los ejemplos de secuencias de ADN adecuadas se proporcionan en SEQ ID N°:1; SEQ ID N°:3; SEQ ID N°:5; SEQ ID N°:7; SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:17 y SEQ ID N°:19.

La presente descripción también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN descritas en la presente memoria. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los especialistas en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al "Maniatis Manual" producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se describe una hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede usar cualquier célula hospedante/sistema de vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también se pueden usar sistemas de expresión de células hospedantes eucarióticas, por ejemplo de mamífero. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen las células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente descripción también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención que comprende cultivar una célula hospedante que contenga un vector de la presente descripción en las condiciones adecuadas que conduzcan a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

- 5 La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario usar una secuencia codificadora de polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células hospedantes. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un
10 segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de
15 manera selectiva la unión de TNF α al p55R. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo de manera selectiva la unión de TNF α al p55R, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

El término 'tratamiento' incluye la terapia terapéutica o profiláctica. Cuando se hace referencia en la presente memoria a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediante el uso de un inhibidor particular o
20 combinación de inhibidores, se debe entender que tal referencia pretende incluir el uso de ese inhibidor o combinación de inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

Los anticuerpos que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo la unión de TNF α al p55R, se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de
25 cualquier enfermedad que resulte de la señalización mediada por p55R, en particular enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias particulares incluyen enfermedades autoinmunitarias desmielinizantes del SNC, esclerosis múltiple (EM), diabetes, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia gravis, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, granulomatosis de Wegener,
30 psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Como se discute en la presente memoria, los anticuerpos anti-TNF α que inhiben de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R, por ejemplo inhibiendo la unión de TNF α al p55R, se pueden usar en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Para tal uso, los agentes se administrarán en
35 general en forma de una composición farmacéutica.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Habitualmente, la composición se suministrará como parte de una composición farmacéutica esterilizada que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede tener cualquier forma
40 adecuada (dependiendo del método deseado para administrarla a un paciente).

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto mediante una diversidad de otras vías, tales como de manera oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal e intracerebroventricular. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso determinado dependerá del anticuerpo particular, del sujeto, y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y del estado físico del sujeto.

45 Los anticuerpos útiles en la invención se pueden administrar en combinación, p.ej. de manera simultánea, de manera secuencial o por separado, con otro u otros compuestos terapéuticamente activos, que pueden ser, por ejemplo, otras terapias contra enfermedades autoinmunitarias, o, p.ej., terapias antineoplásicas.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de forma conveniente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Tal unidad puede contener,
50 por ejemplo pero sin limitación, 750 mg/kg a 0,1 mg/kg dependiendo de la afección a tratar, la vía de administración y la edad, peso y estado del sujeto.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso en la invención pueden tener una amplia diversidad de formas dependiendo, p.ej., de la vía de administración.

55 Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar en forma de un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del

uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión como se conoce en la técnica.

En el caso de preparaciones sólidas orales, tales como polvos, cápsulas y comprimidos, se pueden incluir vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma farmacéutica unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean en general vehículos farmacéuticos sólidos. Además de las formas farmacéuticas habituales expuestas anteriormente, los agentes activos de la invención se pueden administrar también utilizando medios y/o dispositivos de administración de liberación controlada. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes de unión, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, goma de tragacanto, o polivinilpirrolidona; rellenos, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para comprimidos, por ejemplo estearato magnésico, talco, polietilén glicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; o agentes humectantes aceptables tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos se pueden revestir mediante técnicas acuosas o no acuosas habituales según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, y cada una contiene una cantidad predeterminada del agente activo, en forma de un polvo o gránulos, o en forma de una disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión aceite-en-agua o una emulsión líquida agua-en-aceite. Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de poner en contacto el agente activo con el vehículo, que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto hasta la presentación deseada. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se pueden preparar en forma de disoluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilén glicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Se pueden preparar disoluciones, dispersiones y suspensiones para inyección improvisada a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición farmacéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos descritos en los documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos muy conocidos útiles en la presente invención incluyen: el documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; el documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos multi-cámara; y el documento US 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico. Los expertos en la técnica conocen otros muchos implantes, sistemas de administración, y módulos.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular en forma de pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, vendas impregnadas, esprays, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para espolvorear, y similares. Estas composiciones se pueden preparar por medio de métodos convencionales que contienen el agente activo. Así, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales vehículos pueden estar presentes en forma de alrededor del 1% a alrededor del 98% de la composición. Más normalmente, constituirán alrededor del 80% de la composición. Como ilustración solamente, se prepara una crema o pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contiene alrededor del 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tiene la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar en forma de parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo se puede administrar desde el parche mediante iontoforesis.

Para las aplicaciones en tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente en forma de una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o miscible con agua. De manera alternativa, el agente activo se puede formular en una crema con una base de crema aceite-en-agua o una base agua-en-aceite.

- 5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen colirios en los que el agente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen pomadas o cremas tópicas como se mencionaron anteriormente.

- 10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente en forma de supositorios de dosis unitarias. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales usados habitualmente en la técnica, y los supositorios se pueden formar de manera conveniente mezclando la combinación con el/los vehículo(s) ablandado(s) o fundido(s), seguido de enfriamiento y moldeo. También se pueden administrar en forma de enemas.

- 15 La dosis a administrar de un anticuerpo anti-TNF α que inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R variará según el anticuerpo particular, el tipo de enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía de administración seleccionada; la dosis adecuada la puede determinar fácilmente una persona experta en la técnica. Para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en seres humanos y animales, se pueden administrar composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos a pacientes (p.ej., sujetos humanos) a dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaces (p.ej. dosis que dan como resultado la inhibición de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria y/o el alivio de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria) mediante el uso de cualquier vía adecuada de administración, tal como inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos, tales como productos clínicos basados en anticuerpos.

- 25 Las composiciones pueden contener a partir del 0,1% en peso, preferiblemente del 10-60%, o más, en peso, del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad óptima y el espaciado de las dosificaciones individuales de un inhibidor de la invención se determinarán por la naturaleza y el grado de la afección a tratar, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto particular a tratar, y que un médico determinará finalmente las dosificaciones adecuadas a usar. Esta dosificación se puede repetir tan a menudo como sea adecuado. Si se desarrollan efectos secundarios, se puede alterar o reducir la cantidad y/o frecuencia de la dosificación, de acuerdo con la práctica clínica normal.

- 30 La presente invención se describe adicionalmente simplemente a modo de ilustración a través de los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras acompañantes, en las que:

La presente invención se describe adicionalmente simplemente a modo de ilustración a través de los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras acompañantes, en las que:

- 35 Figura 1: ensayo de inhibición de la unión de p55TNFR y p75TNFR que muestra el efecto de diferentes anticuerpos anti-TNF α sobre la unión de TNF α al p55R y al p75R.

Figura 2: muestra el casete de expresión clonado en el fragmento de restricción grande de NotI y XhoI de pBluescript® II SK(+) para generar el vector lanzadera del receptor de bioensayo.

- 40 Figura 3: muestra una titulación de la respuesta de luciferasa inducida por TNF α del receptor de bioensayo p75/CD28-TCR zeta.

Figura 4: muestra el efecto del anticuerpo '462', infliximab y adalimumab sobre la señalización de p55R.

Figura 5: muestra el efecto del anticuerpo '463' sobre la señalización de p55R.

Figura 6: muestra el efecto del anticuerpo '462', infliximab y adalimumab sobre la señalización de p75R.

Figura 7: muestra el efecto del anticuerpo '463' sobre la señalización de p75R.

45 Ejemplos

Ejemplo 1. Aislamiento de un panel de anticuerpos anti-TNF α

Se inmunizaron ratas con TNF α recombinante humano soluble. 4x 5 μ g a intervalos de 3-4 semanas inicialmente en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea.

- 50 Después se sembraron células de bazo de una rata en 40 placas de microtitulación a una densidad celular que asegura que cualquier anticuerpo de unión a TNF α detectado es clonal. Las células se cultivaron después en medios acondicionados de células T (3%) y células EL-4 (5×10^4 /pocillo) durante siete días. Siete días más tarde los

sobrenadantes de estas placas se cribaron mediante ELISA en busca de anticuerpos anti-TNF α mediante el uso de TNF α humano (50 ng/ml) capturado con un anticuerpo policlonal de oveja revestido sobre inmunoplasmas. Los sobrenadantes de los pocillos positivos se ensayaron después adicionalmente en el bioensayo de L929 y en los ensayos de proteínas específicos de los receptores p55 y p75 descritos más adelante.

5 Ejemplo 2. Ensayos de inhibición de la unión a receptor de TNF α

Ensayo de L929

Se usaron las células L929 (una línea celular de fibroblastos de ratón) que expresaban el receptor p55TNF α de ratón, pero no el receptor p75TNF α , para ensayar los anticuerpos anti-TNF α que bloquean la unión de TNF α a este receptor. Estas células son destruidas por TNF α humano si se sensibilizan con un inhibidor de la síntesis de proteínas.

Las células se cultivaron en medio de cultivo de tejidos estándar y se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos el día antes de ser necesarias para el ensayo. El medio de cultivo se retiró, y los sobrenadantes de ensayo se añadieron a pocillos individuales. Después se añadió TNF α recombinante humano a cada pocillo a 200-400 pg/ml en presencia de 1 μ g/ml (concentración final) de actinomicina D. Las placas se incubaron después durante la noche a 37 °C.

Al día siguiente las placas se lavaron suavemente en PBS y las células se fijaron en metanol. Después se tiñeron con 1% de violeta cristal (las células vivas permanecen unidas a las placas y absorben el colorante). La tinción en exceso se eliminó mediante lavado, y las células teñidas restantes se solubilizaron en un 30% de ácido acético. Las placas se leyeron después a 570/405 nM.

Los pocillos que contienen anticuerpos que bloquean la unión de TNF α al p55TNFR de ratón protegen a las células de la citotoxicidad mediada por TNF α , y muestran una señal incrementada en comparación con los pocillos negativos/ de control.

Los pocillos positivos se ensayaron adicionalmente en los ensayos de p55R y p75R.

Ensayo de inhibición de la unión a p55TNFR y p75TNFR

Se revistieron placas de ELISA estándar con un anticuerpo policlonal anti-TNF α humano de oveja diluido 1/10.000. Las placas se bloquearon después con PBS+1% de BSA. Después se añadió TNF α humano a cada pocillo a 25-50 ng/ml. Después de 1 hora se eliminó mediante lavado el TNF α sin unir. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos anti-TNF α se añadieron después a pocillos duplicados. Además, a un pocillo de cada duplicado se le añadió proteína de fusión p55TNFR humano-Fc humano o proteína de fusión p75TNFR humano-Fc humano. Estos se incubaron durante 1 hora, y después se lavaron para eliminar el receptor sin unir. Tras esta etapa, se añadió un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG humano conjugado a peroxidasa (Stratech Scientific) a una dilución 1/2000. Las placas se dejaron durante 1 hr y después se lavaron para eliminar el conjugado sin unir. Después se añadió el sustrato TMB a cada pocillo, y se dejó desarrollar el color. Por lo tanto, se pueden visualizar los pocillos en los que los anticuerpos anti-TNF α han bloqueado la unión de el/los receptor(es).

La Figura 1 muestra la inhibición en porcentaje de la unión de TNF α al p55TNFR y p75TNFR mediante cuatro anticuerpos anti-TNF diferentes. El anticuerpo '3D6' inhibió la unión de TNF α al p55TNFR en un 49,3%, pero solamente inhibió la unión de TNF α al p75TNFR en un 14,6%. En contraste, el anticuerpo 22H3, por ejemplo, inhibió la unión de TNF α al p55R y al p75R en un 78,9 y 71,9%, respectivamente. El anticuerpo 3D6, por lo tanto, bloquea de manera selectiva la unión de TNF α al p55R.

40 Ejemplo 3 Aislamiento de anticuerpos selectivos adicionales

Mediante el uso de la misma población de ratas del Ejemplo 1, se cribaron células B cultivadas para identificar los anticuerpos selectivos hacia TNF α .

El TNF α humano (Strathman Biotech GmbH) se biotiniló con un exceso molar de 10 veces de Sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente siguiendo el protocolo del fabricante. Se mezclaron 5 μ g de TNF α biotinilado con 50 μ l de microesferas revestidas de superavidina de 9,95 micras (Bangs Beads) durante 1 hora a temperatura ambiente en un volumen de 500 μ l (mezcla para 1 x placa de 384 pocillos). Las microesferas se lavaron después 5 veces en tampón de bloqueo de PEG (1% de PEG/0,1% de tween/PBS) para eliminar el TNF α sin unir. Las microesferas revestidas de TNF α se resuspendieron después en aprox. 4 ml de tampón de bloqueo de PEG, y se añadieron 10 μ l a cada pocillo de una placa de 384 pocillos. Se añadieron 10 μ l de cultivo de células B que contenía anticuerpo de rata y 10 μ l de conjugado de anticuerpo de cabra específico anti-Fc gamma de IgG de rata-Cy5 a una dilución 1:1666 al pocillo que contenía las microesferas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora, y después se leyeron en un aparato Applied Biosystems 8200. Se usó un programa informático de Applied Biosystems para identificar los pocillos positivos.

Aproximadamente se cribaron 1400 placas de cultivo de células B, que son aproximadamente 140000 pocillos que

representan aproximadamente 2×10^8 células B.

De los cribados, 2500 pocillos contuvieron anticuerpos que se unen a TNF α .

Estos se cribaron adicionalmente en función de la capacidad de bloquear de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R respecto del p75R mediante el uso de los ensayos descritos en el Ejemplo 4. Los anticuerpos se cribaron primero en función del bloqueo de la señalización de p55R, y los que bloquearon la señalización se ensayaron después en función de la capacidad de bloquear la señalización de TNF α por medio del p75R. Los anticuerpos que bloquearon de manera selectiva la señalización por medio del p55R se aislaron mediante el uso del ensayo de fluorescencia homogénea descrito en el documento WO2004/051268, y se clonaron los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera mediante PCR de transcripción inversa de células B de rata individuales. Las regiones variables se expresaron en formato de IgG recombinante para confirmar la unión y actividad en ensayos de señalización sub-clonando en vectores de expresión que contenían los genes de la región constante del anticuerpo humano (cadena ligera kappa humana y cadena pesada gamma-4 en la que la serina de la posición 241 se ha cambiado por prolina como se describió en el documento Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108) y un anticuerpo quimérico de rata/humano expresado de manera transitoria en células CHO. Las transfecciones de células CHO se llevaron a cabo mediante el uso del procedimiento de Lipofectamina según las instrucciones del fabricante (InVitrogen, n° de catálogo 18324).

Se obtuvieron dos secuencias de anticuerpos, y estas se denominaron '462' y '463'.

Las secuencias de la región V de '462' se proporcionan en SEQ ID N°s: 1, 2, 3 y 4. Las secuencias de la región variable sin las secuencias líder se proporcionan en SEQ ID N°s: 5, 6, 7 y 8. Las secuencias de la región V de '463' se proporcionan en SEQ ID N°s: 15, 16, 17 y 18. Las secuencias de la región variable sin las secuencias líder se proporcionan en SEQ ID N°s: 19, 20, 7 y 8.

Ejemplo 4: Ensayos de señalización de TNFR

4.1 Ensayo de señalización de p55R

Ensayo de Luciferasa de p55 NF κ B

Se usaron células A549-ES-Luc para este ensayo con gen indicador. Las células A549 son un carcinoma de células epiteliales de pulmón que expresan el receptor de TNF p55, y se han transfectado de manera estable con un vector que comprende el promotor de E-selectina (contiene 3 x sitios de unión de NF κ B) unido al gen de luciferasa y un marcador seleccionable para la generación de una línea celular estable.

A549-ES-Luc se cultivaron en los medios siguientes:

RPMI 1640 (Sin Fenol)

+ 10% de FCS

+ Glutamina 2 mM

+ 1 mg/ml de G418 (Life Tech, disolución de reserva de 50 mg/ml)

Las células A549-ES-luc se colocaron en placas de 96 pocillos opacos blancos (Perkin Elmer) mediante el uso de una suspensión celular de $1,5 \times 10^5$ células/ml; 100 μ l/pocillo = 15.000 células/pocillo. Las células se dejaron adherir durante la noche a 37 °C/5% de CO $_2$. Al día siguiente, los medios se aspiraron y se sustituyeron por 100 μ l de anticuerpo en medio de ensayo que se había pre-incubado durante 30 minutos con TNF α humano a una concentración final de 3 ng/ml. Las células se incubaron durante 5 horas a 37 °C/5% de CO $_2$. La expresión de luciferasa se ensayó después mediante el uso de un equipo de ensayo con gen indicador de luciferasa (LucLite de Perkin Elmer). La placa se leyó después en un lector de placas de luminiscencia, el LJL Analyst.

4.2 Ensayo de señalización de p75

Se usaron células Jurkat que se habían transfectado de manera estable con un vector que contenía un casete que codifica el dominio extracelular de p75R unido a las regiones de señalización intracelulares de CD28 y TCR zeta para ensayar la señalización de p75. Dentro del mismo vector, hay 5 sitios de unión para NF κ B con una región promotora mínima de E-selectina, y esta controla la expresión del gen indicador de luciferasa, y un marcador seleccionable para la generación de líneas celulares estables. La estimulación del receptor de bioensayo p75 con su ligando, TNF α humano, conduce por medio de las regiones CD28/zeta del receptor de bioensayo al inicio de una cascada de señalización dentro de la célula. La cascada de señalización induce la activación de NF κ B y permite la transcripción del gen indicador de luciferasa. Los niveles de activación se pueden medir después en un ensayo de luciferasa. Los anticuerpos que pueden bloquear esta activación impedirán la expresión de luciferasa.

Construcción de un casete de clonación de expresión del receptor y vector lanzadera.

Se usó un vector lanzadera intermedio que contenía el casete de expresión completo necesario para la expresión del receptor de bioensayo. Este vector incluye el casete de clonación ideado en pBluescript SK+ (Stratagene) descrito previamente (Finney et al., J. Immunol. 2004 172: 104). En posición 5' de este casete de clonación está el promotor de HCMV, y la señal de poliadenilación de SV40 está en posición 3' de este casete de clonación. El casete de clonación consiste en un componente de unión del dominio extracelular (DEC), un componente transmembrana y un componente de la región de señalización, y facilita el intercambio sencillo de cada componente individual. La combinación de los siguientes fragmentos de ADN generó el vector lanzadera:

5

A) El esqueleto del vector de pBluescript II SK(-) (Stratagene) en un fragmento NotI a XhoI

B) El casete de clonación descrito previamente en un fragmento HindIII a EcoRI

10

C) El promotor de HCMV en un fragmento NotI a HindIII

D) La señal de poliadenilación de SV40 en un fragmento EcoRI a XhoI.

La generación de este vector lanzadera se muestra en la Figura 2.

Construcción de los fragmentos del componente de unión, transmembrana y de señalización

Fragmento HindIII a NarI del componente de unión del dominio extracelular del receptor de TNF α p75 humano.

15

Un fragmento que comprendía la secuencia líder y los residuos del dominio extracelular 1 a 257 (ref. de GenBank: NM 001066) del receptor de TNF- α p75 humano se clonó mediante PCR con el uso de los oligonucleótidos 4023 (SEQ ID N°:22) y 4024 (SEQ ID N°:23) a partir del plásmido pORF9-hTNFRSF1B (Invivogen). El oligonucleótido 4023 introduce un sitio HindIII en 5' y la secuencia Kozak. El oligonucleótido 4024 introduce un sitio NarI en 3'. El producto de PCR se digirió después con las enzimas de restricción HindIII y NarI.

20

Fragmento NarI a EcoRI de la región transmembrana y de señalización de CD28 humano y el componente de la región de señalización de TCR zeta humano.

Un fragmento que comprendía los residuos 135 a 202 de la región transmembrana y de señalización de CD28 humano y los residuos 31 a 142 de la región intracelular de TCR zeta humano se digirió de un plásmido previamente descrito (Finney et al., J. Immunol. 2004 172: 104) con las enzimas de restricción NarI y EcoRI.

25

Construcción de vectores con gen indicador del receptor de bioensayo

Se generó el casete de expresión de longitud completa para el receptor de bioensayo combinando los componentes de unión, transmembrana y de señalización descritos anteriormente en el vector lanzadera descrito anteriormente. Este se subclonó después en el vector del gen indicador pNifty2-Luc (Invivogen). Este vector contiene un gen indicador de Luciferasa bajo control de un promotor inducible de NF- κ B y el marcador seleccionable ZeocinTM para la selección en células de E. coli y de mamífero. El casete de expresión del receptor de bioensayo se extrajo del vector lanzadera en un fragmento NotI a NotI y se clonó en el sitio NotI de pNifty2-Luc.

30

Generación de líneas celulares estables con gen indicador del receptor de bioensayo

El ADN plasmídico del vector se transfectó a la línea celular de leucemia de células T humanas, Jurkat E6.1, mediante el uso del dispositivo Amaxa Nucleofector según las instrucciones del fabricante (Amaxa Biosystems). Después se generaron líneas celulares estables mediante cultivo en ZeocinTM a una concentración de 200 μ g/ml.

35

Análisis del anticuerpo anti-TNF α humano mediante el uso de un receptor de bioensayo p75/CD28-TCR zeta.

Se generó una línea celular estable que expresaba un receptor de bioensayo que comprende el componente de unión del dominio extracelular del receptor de TNF α p75 humano, la región transmembrana y de señalización de CD28 humano, y los componentes de la región de señalización de TCR zeta humano como se describió anteriormente. A estas células se les añadió una titulación de TNF α humano, y la cantidad de Luciferasa producida se determinó 4 horas más tarde con un equipo de ensayo Luclite (Promega) según las instrucciones del proveedor. La respuesta de Luciferasa inducida por TNF α del receptor de bioensayo p75/CD28-TCR zeta se muestra en la Figura 3. Se seleccionó una concentración de TNF α de esta titulación y se usó para estudiar la capacidad de un anticuerpo anti-TNF α de bloquear la producción de Luciferasa por medio del receptor de bioensayo p75/CD28-TCR zeta.

40

45

Medios de Ensayo:

500 ml de DMEM (sin fenol)

+ 10% de Suero Bovino Fetal

+ Glutamina 2 mM

+ 1 ml de Normacina

+ 200 µg/ml de zeocina

+ 1% de disolución de potenciador, inhibidor de proteasas

5 Las células Jurkat se colocaron en placas de 96 pocillos opacos blancos mediante el uso de una suspensión celular de 2×10^6 células/ml. Después se añadieron anticuerpos a la placa en la escala de titulación deseada. La placa se incubó durante 30 minutos a 37 °C, y se añadieron 10 µl de ligando de TNFα humano a cada pocillo a una concentración de 30 ng/ml para proporcionar una concentración final de 3 ng/ml de TNFα humano en cada pocillo. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C. La expresión de luciferasa se ensayó después mediante el uso de un equipo de ensayo de gen indicador de luciferasa (equipo LuLite 1000, Perkin-Elmer).

10 Resultados

El efecto del anticuerpo '462' y de los anticuerpos anti-TNFα disponibles comercialmente Adalimumab e Infliximab sobre la producción de Luciferasa en el ensayo de señalización de p55R se muestran en la Figura 4. Es evidente que los tres anticuerpos inhiben la señalización de TNFα por medio del p55R. La Figura 5 muestra que el anticuerpo '463' también inhibe la señalización de TNFα por medio del p55R.

15 El efecto del anticuerpo '462' y de los anticuerpos anti-TNFα disponibles comercialmente Adalimumab e Infliximab sobre la producción de Luciferasa en el ensayo de señalización de p75R se muestran en la Figura 6. Es evidente que solamente Adalimumab e Infliximab inhiben la señalización de TNFα por medio del p75R, mientras el anticuerpo '462' deja prácticamente inalterada la señalización de TNFα por medio del p75R. La Figura 7 muestra que el anticuerpo '463' también deja prácticamente inalterada la señalización de TNFα por medio del p75R. Ambos anticuerpos '462' y '463' fueron significativamente menos potentes en el ensayo de señalización de p75R que en el ensayo de señalización de p55R.

Los anticuerpos '462' y '463', por lo tanto, inhiben de manera selectiva la señalización de TNFα por medio del p55R.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TNF α , caracterizado porque el anticuerpo inhibe de manera selectiva la señalización de TNF α por medio del p55R reduciendo la señalización a través suyo respecto del p75R, inhibiendo la señalización de TNF α por medio del p55R en un grado mayor que la inhibición de la señalización de TNF α por medio del p75R, en el que el anticuerpo tiene una CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio de p55R que es al menos 5 veces inferior a su CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio de p75R, para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
2. Un anticuerpo anti-TNF α para el uso según la reivindicación 1 que inhibe la señalización de TNF α por medio del p55R en un 80% o más.
3. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo o derivado del mismo.
4. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo con injerto de CDRs.
5. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 3 ó 4, en el que el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o un fragmento de unión al epítipo del mismo.
6. Un anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo está conjugado a una o más molécula(s) efectora(s).
7. Un anticuerpo anti-TNF α que comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:9 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:10 o SEQ ID N°:21 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:11 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:12 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:13 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:14 para CDR-L3, en el que el anticuerpo tiene una CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio de p55R que es al menos 5 veces inferior a su CI₅₀ para la señalización de TNF α por medio de p75R.
8. Un anticuerpo anti-TNF α según la reivindicación 7, que comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:20.
9. Un anticuerpo anti-TNF α según la reivindicación 7, que comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID N°:8.
10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF α según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

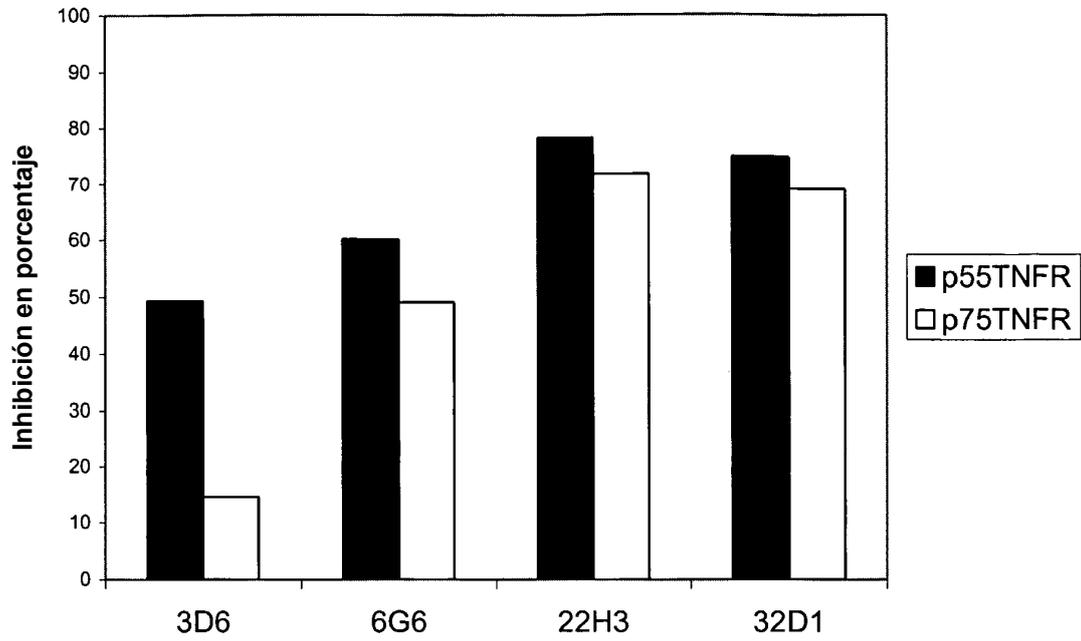


Figura 2

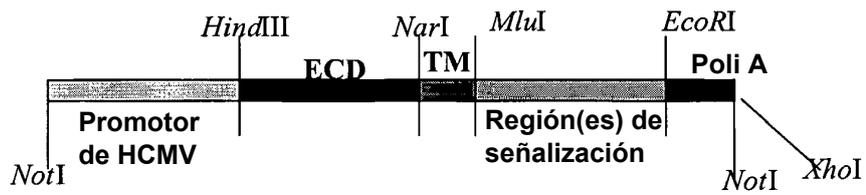


Figura 3

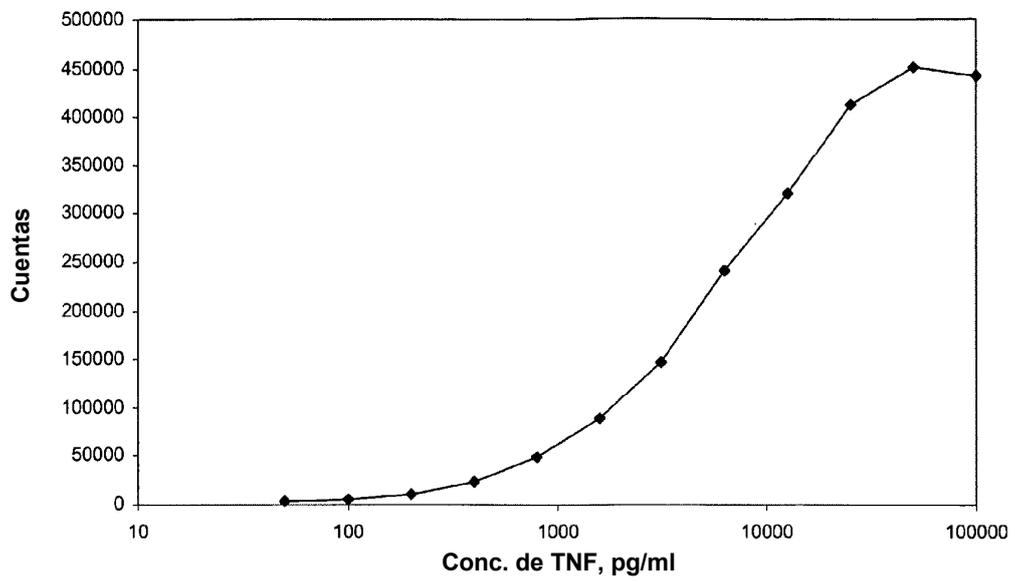


Figura 4

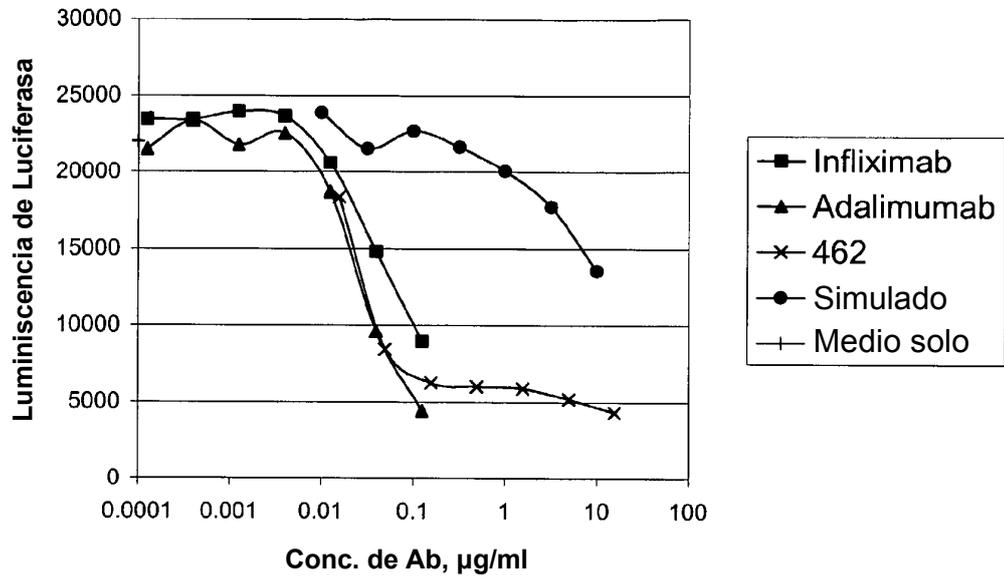


Figura 5

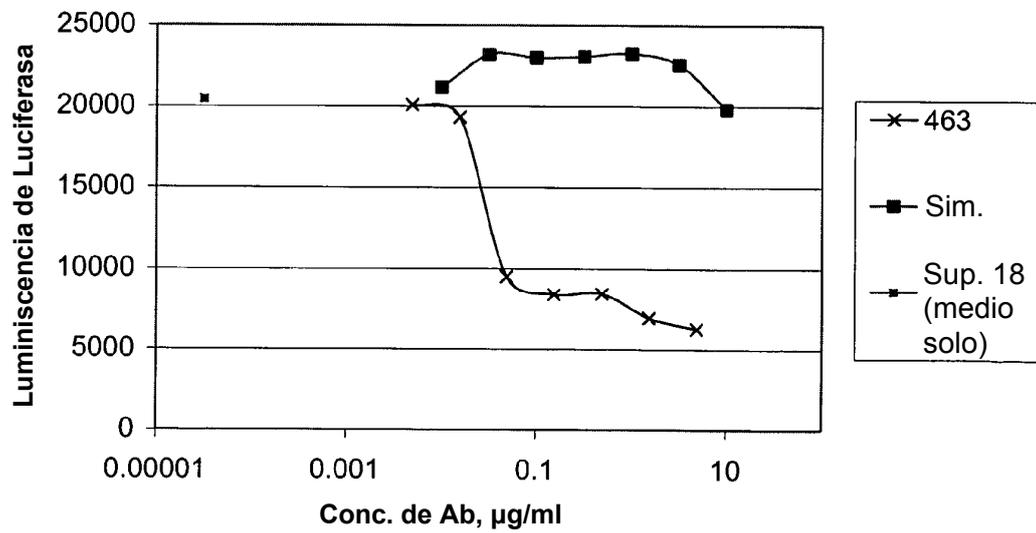


Figura 6

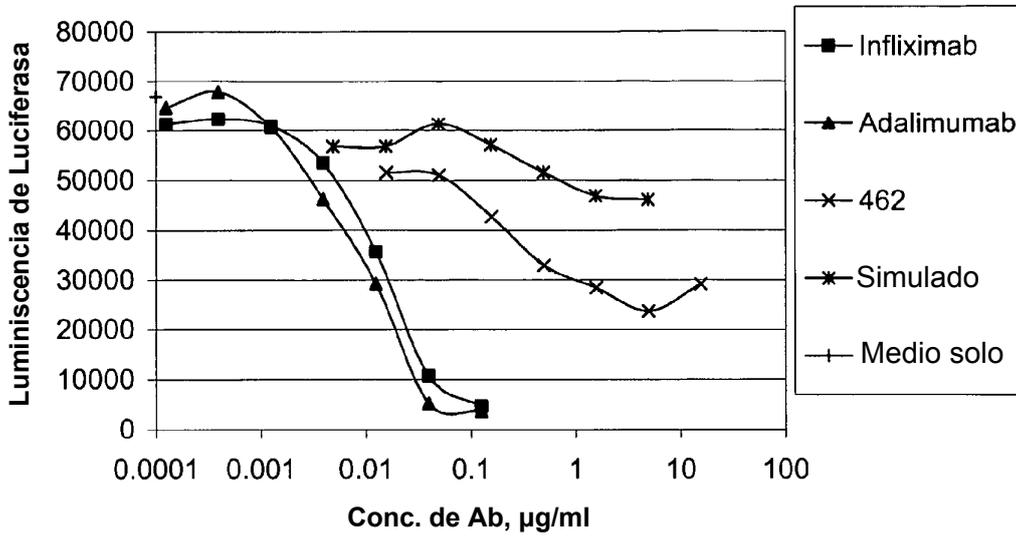


Figura 7

