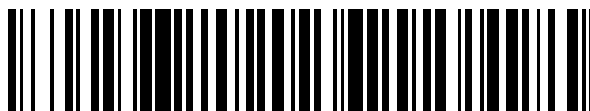


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 586**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/EP2011/066109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO2012035141**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11761544 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2616489**

54 Título: **Anticuerpo anti-huTNFR1**

30 Prioridad:

**16.09.2010 EP 10177080**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

**BALIOPHARM AG (100.0%)  
Stänzlergasse 4  
4051 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KONTERMANN, ROLAND;  
PFIZENMAIER, KLAUS;  
HERRMANN, ANDREAS y  
ZETTLITZ, KIRSTIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 618 586 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

Anticuerpo anti-huTNFR1

La invención se refiere a un anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1 y a preparaciones farmacéuticas para uso como un antagonista de TNF.

5 **Antecedentes**

10 El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina pleiotrópica y un mediador central de la inflamación. Los niveles elevados de TNF están asociados con varias enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, y enfermedad de Crohn. Se han aprobado varios reactivos neutralizantes de TNF para el tratamiento de estas enfermedades, incluyendo receptores de TNF soluble (etanercept) así como anticuerpos anti-TNF (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab), y muchos más están en desarrollo. Con más de 1 millón de pacientes tratados con antagonistas de TNF, la eficacia terapéutica está bien documentada. Sin embargo, la inhibición global de TNF durante un periodo de tiempo prolongado incrementa el riesgo de reactivación de tuberculosis, infecciones graves e incluso malignidades. Consecuentemente, la información médica de todas las medicinas anti-TNF aprobadas incluye advertencias y precauciones extensas.

15 Dos receptores de TNF (CD120a, TNFR1 y CD120b, TNFR2) median la transducción de la señal después de la unión de TNF (Locksley et al. Cell. 2001 feb 23; 104(4):487-501). Las respuestas pro-inflamatorias están mediadas principalmente por el TNFR1 expresado de manera ubicua. TNFR1 se activa tanto por la forma unida a membrana de TNF (mTNF) como por TNF soluble (sTNF), que se produce a partir de mTNF por escisión proteolítica. Por el contrario, TNFR2, expresado de una manera más restringida, por ejemplo, por las células inmunes, células endoteliales y neuronas, sólo puede ser activado por mTNF. La activación de TNFR2 induce principalmente señales anti-apoptóticas y puede dar lugar a proliferación celular *in vitro*. Además, TNFR2 parece jugar un papel en la homeostasis y regeneración tisular.

25 La inhibición selectiva de la señalización de TNFR1 ha ganado una atención creciente como alternativa a la neutralización global de TNF, que afecta a los dos receptores de TNF. Recientemente, se ha descrito una muteína de TNF (R1antTNF) que neutraliza selectivamente la actividad de TNFR1 (Shibata et al. Cytokine. 2008 Nov;44(2):229-33. Epub 2008 sep 23). Esta muteína de TNF, administrada bien como proteína no modificada o como proteína PEGilada (PEG-R1antTNF), demostró eficacia terapéutica en modelos de hepatitis aguda murina y un modelo de artritis inducida por colágeno murina. El efecto beneficioso de la inhibición selectiva de TNFR1 fue apoyado adicionalmente por los resultados de una muteína de TNF dominante negativa (XPro1595), que es capaz de formar complejos inactivos con sTNF, inhibiendo así selectivamente la acción pro-inflamatoria mediada por TNFR1 mientras preserva la inmunidad innata a infecciones (Olleros et al. J Infect Dis. 2009 abr 1; 199(7): 1053-63).

30 La inhibición selectiva de TNFR1 también puede conseguirse con anticuerpos específicos de TNFR1. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, H398, y anticuerpo descrito en US 5736138, con selectividad para TNFR1 humano, mostraron una inhibición potente de la transducción de la señal y citotoxicidad mediadas por TNF (Moosmayer et al. Ther Immunol. 1995 feb;2(1):31 -40).

35 Una versión humanizada de H398 se describe por WO2008/113515A2. Específicamente, se produjo un anticuerpo humanizado como fragmento Fab (IZI-06.1) y presentó actividades neutralizantes *in vitro* comparables a las del fragmento Fab del anticuerpo parental. De forma importante, el anticuerpo H398 no alcanzó el bloqueo completo de la actividad de TNF, lo que se interpretó por la conversión de un antagonista en un agonista parcial a altas concentraciones. Esto se explica por el incremento dependiente de la dosis del entrecruzamiento de TNFR1, formando potencialmente así complejos de señalización de TNFR1 funcionales, independientes de ligando. Así, se encontró que el Fab monovalente era superior sobre el anticuerpo de longitud completa (divalente) debido a la ausencia completa de capacidad de entrecruzamiento de TNFR1, evitando de esta manera cualquier potencial de señalización intrínseco.

40 Se encontró que los anticuerpos frente a TNFR1 tenían un potencial agonista mediante la inducción de una respuesta que mimetiza el ligando. Esta respuesta sugiere que la transducción de la señal se inicia por la agregación de receptores por la unión de los trímeros de TNF multivalentes.

Espevik et al (J. Exp. Med. 1990, 171 :415-426) describen el anticuerpo agonista del receptor TNFR1, htr-9, que es un anticuerpo de longitud completa que se ha encontrado que mimetiza la acción de TNFalfa.

50 WO2010094720 describe anticuerpos anti-TNFR1 de dominio único (dAb) y construcciones que comprenden dichos anticuerpos de dominio único.

Brocks et al. (Immunotechnology 3(3) 173-184 (1997)) describen derivados scFv mono y bivalentes antagonistas del receptor de TNF.

WO2008113515 describe el anticuerpo anti-TNFR1 H398 y derivados Fab y scFv humanizados de éste.

Armour et al. (European Journal of Immunology 29(8) 2613-2624 (1999)) describen moléculas de IgG1 humana recombinante con mutaciones para reducir la unión a FcγRI.

5 Los plásmidos pFUSE-Fc de InvivoGen (San Diego, CA, EEUU) se proporcionan para diferentes aplicaciones, por ejemplo, para uso terapéutico sin actividad de depleción celular (InvivoGen: "IgG-Fc engineering for therapeutic use" 2007, p. 1 -2, XP002616317).

10 Se sabía que los anticuerpos anti-TNFR1 divalentes presentaban el riesgo de reacciones pro-inflamatorias, incluyendo citotoxicidad y apoptosis, que serían contraproducentes en el tratamiento de afecciones patológicas mediadas por TNF. Los fragmentos de anticuerpo monovalentes, como scFv, dAb o Fab tienen típicamente una vida media corta y por lo tanto tienen un uso limitado como un producto farmacéutico. Era así el objetivo proporcionar un agente anti-TNFR1 mejorado que tuviera una vida media prolongada, pero evitando cualesquiera efectos secundarios causados por una actividad agonista de TNF.

El objeto se resuelve por el contenido según se reivindica.

### Resumen de la invención

15 Según la invención se proporciona un anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1, que tiene una región Fc modificada eficiente en la mediación de la función efectora. En particular, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo IgG1 adecuado para uso terapéutico, que es un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa.

20 Específicamente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano (huTNFR1) del tipo IgG1, que tiene una región Fc modificada deficiente en la mediación de la función efectora, que es un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de CDR identificadas por SEQ ID 1-6, y la secuencia Fc humana identificada por SEQ ID 9 que comprende al menos una mutación para modular a la baja la función efectora seleccionada del grupo que consiste en E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S.

Preferiblemente, la región Fc se modifica por glicoingeniería para modular a la baja la función efectora.

25 Preferiblemente, la región Fc comprende una cadena pesada con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S (numeración índice Kabat EU). Preferiblemente, al menos dos de dichas mutaciones, más preferiblemente al menos tres, cuatro, cinco o las seis mutaciones se preparan por ingeniería en la secuencia de Fc de IgG1 humana.

Preferiblemente, el anticuerpo según la invención se une específicamente a un epítipo que comprende la CRD1 distal de membrana y el subdominio A1 de CRD2 de huTNFR1.

30 El epítipo de unión específicamente preferido se representa por aminoácido 1 a 70 en la región N-terminal de huTNFR1.

Según una realización preferida, el anticuerpo se une específicamente al epítipo reconocido por el anticuerpo H398.

35 Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a huTNFR1 por al menos dos sitios de unión. En particular, el anticuerpo es al menos bivalente (es decir, unión al mismo antígeno o epítipo por dos valencias) o biespecífico (unión a dos antígenos o epítopos diferentes).

Específicamente, el anticuerpo es un anticuerpo H398 humanizado.

Según un aspecto, se proporciona una preparación farmacéutica que comprende el anticuerpo según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Según otro aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo según la invención empleando un sistema de expresión de mamífero recombinante.

45 Preferiblemente, el sistema de expresión emplea una línea de producción CHO. Según un aspecto específico, el anticuerpo se proporciona para uso en el tratamiento de inflamación crónica no infecciosa de las articulaciones, piel e intestino, por ejemplo, para uso como un antagonista de TNF sin formar un complejo de señalización agonista de TNFR1, como una alternativa al tratamiento con un terapéutico anti-TNF. Dichos antagonistas de TNF, también considerados como antagonistas biológicos de TNF, se proporcionan típicamente para uso terapéutico cuando se ha probado la relevancia biológica de la función de TNF en la patogénesis de la inflamación crónica no infecciosa de articulaciones, piel e intestino.

El uso preferido es para un tratamiento de segunda línea en el que otros terapéuticos anti-TNF o DMARD no biológicos (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad) han fracasado.

50 Específicamente, el anticuerpo se proporciona para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, esclerosis

múltiple, fallo cardíaco congestivo, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda y crónica, incluyendo ictus, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, o cáncer.

**Figuras**

5 Figura 1: Caracterización de ATROSAB. a) Análisis por SDS-PAGE de ATROSAB purificado (4 µg/carril, tinción Coomassie) analizado en condiciones no reductoras (1) o reductoras (2), b) Cromatografía de exclusión por tamaño de ATROSAB (se indica la posición de proteínas estándar), c) ELISA de ATROSAB y H398 para unión a TNFR1-Fc humano.

10 Figura 2: Análisis por citometría de flujo de la unión de ATROSAB a fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) transfectados con TNFR1-Fas humano (a) o TNFR2-Fas humano (b). c) Titulación de la unión de ATROSAB y H398 a MEF-TNFR1-Fas (n=3).

15 Figura 3: a) Análisis por SDS-PAGE de TNFR1-Fc humano purificado (1, 4), TNFR1-Fc de ratón (2,5) y TNFR1-Fc de rhesus (3, 6) (4 µg/carril, tinción Coomassie) analizado en condiciones reductoras (1-3) y no reductoras (4-6). b) ELISA de la unión de ATROSAB y H398 (5 µg/ml) a TNFR1-Fc humano purificado, TNFR1-Fc de rhesus y TNFR1-Fc de ratón (100 ng/pocillo). La unión se detectó por anticuerpo anti-molGg (específico de Fc) conjugado con HRP o anticuerpo anti-Fab humano, respectivamente. La unión de un anticuerpo anti-Fc humano (anti-Fc) se incluyó como control de recubrimiento.

20 Figura 4: Determinación de la afinidad de H398 y ATROSAB para la unión a TNFR1-Fc humano y de rhesus por medidas de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), a) Unión de H398 a TNFR1-Fc humano, b) unión de ATROSAB a TNFR1-Fc humano, c) unión de H398 a TNFR1-Fc de rhesus, y d) unión de ATROSAB a TNFR1-Fc de rhesus.

Figura 5: Inhibición de la citotoxicidad mediada por TNF (1,25 ng/ml TNF) en células Kym-1 por ATROSAB y H398. Las células se analizaron después de 6 h por tinción con cristal violeta (n = 3). El máximo (10% de viabilidad del control) y mitad del máximo (55% de viabilidad del control) se presentan en líneas punteadas.

25 Figura 6: Inhibición de la secreción de IL-6 e IL-8 inducida por TNF por ATROSAB y H398. Se incubaron células HeLa (a) o células HT1080 (b) con TNF (1 ng/ml) y concentraciones crecientes de ATROSAB o H398 y se determinó la secreción de citoquinas por ELISA (n = 3). Se incluyó IgG humana (hulgG) como control negativo. De la misma manera, se determinaron los efectos de anticuerpos sobre la secreción de citoquinas en ausencia de TNF. Comparados con TNF, ambos anticuerpos tuvieron sólo efectos marginales sobre la secreción de IL-6 (c) e IL-8 (d).

30 Figura 7: Vidas medias plasmáticas de ATROSAB y H398 después de una inyección i.v. como única dosis (25 µg) en ratones CD1. Se determinaron las concentraciones séricas de anticuerpos por ELISA.

35 Figura 8: a) Mapeo de epítomos de ATROSAB y H398 usando proteínas de fusión TNFR1-Fc de tipo salvaje y quiméricas humana/de ratón. Se analizaron los anticuerpos (0,1 nM) por ELISA para unión a las proteínas de fusión TNFR1-Fc. Se incluyó TNF humano (huTNF) etiquetado con His como control. b) Comparación de secuencias de la región del epítomo identificada (aa 1 -70, SEQ ID NO: 19) de TNFR1 humano (huTNFR1), de ratón (moTNFR1), y de rhesus (rhTNFR1). Los residuos de cisteína están marcados con cajas grises y las 2 posiciones (P23, Q24) analizadas por mutagénesis dirigida a sitio están marcadas por asteriscos.

40 Figura 9: Información de secuencia de ATROSAB: a) cadena pesada (SEQ ID NO: 10), b) VH (SEQ ID NO: 11), c) CH1 (SEQ ID NO: 12), d) bisagra (SEQ ID NO: 13), e) CH2 (SEQ ID NO: 14), f) CH3 (SEQ ID NO: 15), g) cadena ligera (SEQ ID NO: 16), h) VL (SEQ ID NO: 17), i) CL (SEQ ID NO: 18).

Figura 10: Información de secuencia SEQ ID: 1 -8.

Figura 11: Actividad CDC reducida de ATROSAB: ensayo de unión a C1q para determinar la actividad CDC. Intervalo de concentración de anticuerpo diana: 0,31 µg/ml-20 µg/ml (dilución 1:2); Concentración de C1q: 5 µg/ml; Concentración de anticuerpo secundario: 10 µg/ml. anticuerpo de referencia: Herceptina (trastuzumab, Roche), Remicade (infiximab, Centocor, Inc.), H398 (US5736138); IgG2a inespecífica (control negativo).

**45 Descripción detallada de la invención**

50 Según la invención se produjo un anticuerpo que dirigido a TNFR1 humano sin reactividad cruzada para unión a TNFR2. La inhibición selectiva de TNFR1 proporciona la oportunidad de neutralizar la actividad pro-inflamatoria o respuestas inflamatorias de TNF mientras se mantienen las respuestas inmunológicas ventajosas mediadas por TNFR2. Específicamente, se preparó un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa dirigido a hu-TNFR1 (denominado en la presente memoria ATROSAB). Con el fin de evitar las funciones efectoras mediadas por Fc y la citotoxicidad respectiva, se usó una cadena pesada deficiente en ADCC y CDC. Así, los efectos secundarios no deseados, tales como inhibición de la unión de TNF a TNFR2 o citotoxicidad mediada por Fc pueden evitarse por el anticuerpo según la invención.

ATROSAB se produjo en células de mamífero y mostró una unión y comportamiento neutralizante similares a la IgG H398 de ratón parental. Sorprendentemente, sin embargo, no hubo la actividad agonista que se habría esperado con dicho anticuerpo de longitud completa.

5 Se describió hasta el momento que los anticuerpos anti-TNFR1, particularmente el anticuerpo htf-9, tenían actividad agonista activando la función de señal de TNFR1 debido a la unión divalente y el potencial de entrecruzamiento. Por lo tanto, no se esperaba que ningún anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1 con funciones efectoras de Fc moduladas a la baja no mostrarán dicha actividad agonista. A diferencia de asunciones previas, resultó que el anticuerpo H398 carecía de dicha actividad agonista de TNFR1 no deseada. El anticuerpo de la invención puede usarse así sorprendentemente como un antagonista de TNF sin efectos secundarios, tales como los inducidos mediante la activación de la transducción de la señal de TNFR1 o la citotoxicidad mediada por células inmunes efectoras dirigidas mediante el receptor de Fc hacia la parte Fc de la molécula de anticuerpo.

El término "anticuerpo del tipo IgG1" tal y como se usa en la presente memoria se referirá a cualquier clase de anticuerpo que puede unirse a un antígeno, incluyendo anticuerpos naturales, anticuerpos mutados y anticuerpos (semi)-sintéticos, siempre que el anticuerpo incluya una región Fc de IgG1.

15 El término se referirá específicamente a un anticuerpo de un tipo IgG1 que tiene la estructura determinada por una cadena pesada que comprende específicamente la región Fc de IgG1, preferiblemente un fragmento Fc humano, variantes y derivados respectivos de ésta. Las realizaciones específicas se refieren al anticuerpo IgG1 de longitud completa o combinaciones de dominios de anticuerpo que incluyen la región Fc de IgG1. Entre las construcciones específicas, puede combinarse cualesquiera dominios variables de anticuerpo con función de unión a antígeno con una región Fc, como dominios de las cadenas pesada y ligera de la región variable (tales como dAb, Fd, V $\lambda$ , V $\kappa$ , VH, VHH) combinadas con dominios constantes de anticuerpo, incluyendo la región Fc.

20 Los anticuerpos IgG son moléculas grandes de aproximadamente 150 kDa compuestas por 4 cadenas peptídicas. Los anticuerpos contienen dos cadenas pesadas de aproximadamente 50 kDa y dos cadenas ligeras de aproximadamente 25 kDa, presentando así una estructura cuaternaria tetramérica. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí y a una cadena ligera cada una por enlaces disulfuro. El tetrámero resultante tiene dos mitades que conjuntamente forman la forma semejante a una Y. Cada extremo del tenedor contiene un sitio de unión a antígeno. Los anticuerpos de la invención pueden prepararse por ingeniería para unión bi- o multi-específica, o bi- o multivalente, preferiblemente se obtienen al menos dos o más, por ejemplo, al menos tres o cuatro sitios de unión específicos para epítopos de antígenos en el anticuerpo según la invención. El anticuerpo divalente preferido según la invención se une a TNFR1 por dos sitios de unión, preferiblemente formados por los dominios variables del anticuerpo VH/VL.

35 El término "región Fc" tal y como se usa según la invención se refiere a la región de cola de un anticuerpo que típicamente interacciona con receptores de la superficie celular denominados receptores de Fc y algunas proteínas del sistema del complemento. Esta propiedad permite a los anticuerpos activar el sistema inmune. En IgG1, la región Fc está compuesta por dos fragmentos de proteína idénticos, derivados del segundo (CH2) y tercer (CH3) dominios constantes de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Las regiones Fc de las IgG presentan un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Los N-glicanos unidos a este sitio son predominantemente estructuras de diantena fucosiladas en el núcleo del tipo complejo. Adicionalmente, pequeñas cantidades de estos N-glicanos también presentan GlcNAc bisecadas y residuos de ácidos siálicos unidos en  $\alpha$ -2,6.

40 Aunque el anticuerpo según la invención podría proporcionarse como un anticuerpo de roedor, tal como anticuerpo murino, se prefiere proporcionar un anticuerpo humanizado, incluyendo anticuerpos quiméricos para uso en pacientes humanos.

45 No hay limitación respecto a la técnica de humanización del anticuerpo, siempre que el anticuerpo se una al antígeno deseado. Los ejemplos de humanización incluyen, sin limitación a ésta, injerto de región determinante de la complementariedad (injerto de CDR) (Jones et al. 1986, Nature 321, 522-525), injerto de residuos determinantes de la especificidad (injerto de SDR) (Kashmiri et al., 2005, Methods 36, 25-34), modificación en superficie de dominios variables (Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973), selección basada en estructura y humanización por injerto de CDR (Hwang et al., 2005, Methods 36, 35- 42), y estrategias de des-inmunización (Hellendom et al., 2004, Cancer Cell International 4 (Spl. I), 20).

50 La expresión "anticuerpo humanizado" usada en la presente memoria significa cualquier anticuerpo en el que se usa ingeniería de proteínas para reducir la cantidad de secuencia de proteína extraña ("no humana") por intercambio, por ejemplo, de regiones constantes de anticuerpo de roedor y/o marcos de dominio variable o residuos marco con secuencias que se encuentran en anticuerpos humanos.

55 En una realización específica de la presente invención, el anticuerpo según la presente invención es un anticuerpo humanizado, que contiene secuencias de aminoácido de origen humano y otras de origen no humano, por ejemplo, de roedor.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención o región Fc deriva de un anticuerpo humanizado que se puede obtener, por ejemplo, por tecnología de ácido nucleico recombinante. A este respecto, el anticuerpo, o al

menos un fragmento de éste, puede contener una o más mutaciones o variaciones, tales como aminoácidos o ácidos nucleicos añadidos, delecionados o sustituidos, siempre que no tenga un efecto negativo en la interacción con huTNFR1. Además, el anticuerpo puede contener una o más mutaciones o variaciones, tales como aminoácidos o ácidos nucleicos añadidos, delecionados o sustituidos, que tienen un efecto positivo en la interacción de huTNFR1 y que mejoran la actividad antagonista de dicha molécula. En particular, dichas variantes mutadas tienen una mejor afinidad y/o una mejor actividad inhibitora.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado que tiene la misma especificidad de unión que el anticuerpo murino H398, y deriva preferiblemente de dicho anticuerpo parental. Aunque la especificidad de unión es preferiblemente la misma, la especificidad fina puede cambiar debido a la humanización u otras técnicas de mutación.

Según un ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-TNFR1 humano de ratón H398 que presenta actividad neutralizante de TNFR1 se humanizó. Este anticuerpo humanizado se ha convertido en una molécula de IgG1 (ATROSAB) que contiene una región Fc modificada deficiente en la mediación de funciones efectoras. El ATROSAB purificado, producido en células CHO, mostró una unión fuerte a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana y de rhesus y fibroblastos embrionarios de ratón transfectados con una proteína de fusión de TNFR1 recombinante con una afinidad idéntica al anticuerpo de ratón parental H398. Usando moléculas de TNFR1 quiméricas humana/de ratón, se mapeó el epítipo de ATROSAB en la región N-terminal (residuos de aminoácido 1-70) que comprende el primer dominio rico en cisteína (CRD1) y el sub-dominio A1 de CRD2. *In vitro*, ATROSAB inhibió efectivamente las respuestas típicas mediadas por TNF como inducción de apoptosis y activación de la expresión de genes dependiente de NFκB tal como la producción de IL-6 e IL-8. Se mostró además que ATROSAB no mimetiza la unión de TNF a TNFR1 y así no desencadena la expresión y liberación no deseadas de citoquinas por células HeLa o HT1080 en ausencia de TNF. Además, en células T de sangre periférica humana y granulocitos, no pudo discernirse actividad agonista de ATROSAB en los modelos de respuesta celular dependiente de TNF de activación de células T y producción de oxígeno, respectivamente.

Resultó que el anticuerpo más preferido de la presente invención se unió al epítipo que comprende o consiste esencialmente en al menos la CRD1 distal de membrana y subdominio A1 de CDR2 de huTNFR1.

En una realización específica, el anticuerpo frente a huTNFR1 según la invención comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de H398, tal como se describe en WO2008/113515, es decir, SEQ ID NOs: 1 a 6, que confieren unión a huTNFR1. Pueden estar presentes múltiples copias o variantes genéticas de cualquiera de las CDR en el anticuerpo frente a huTNFR1 de la presente invención, siempre que el anticuerpo muestre una afinidad suficiente hacia TNFR1 humano.

Según una realización específica, el anticuerpo frente a huTNFR1 de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO.: 7 como dominio variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO.: 8 como dominio variable de la cadena ligera (VL).

Las secuencias SEQ ID NO 1-8 son como sigue:

SEQ ID NO 1: CDR1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Ile Asn

SEQ ID NO 2: CDR2

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala

SEQ ID NO 3: CDR3

Trp Asp Phe Leu Asp Tyr

SEQ ID NO 4: CDR4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr

SEQ ID NO 5: CDR5

Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

SEQ ID NO 6: CDR6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

SEQ ID NO 7: VH

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

SEQ ID NO 8: VL

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

5 En otra realización más de la presente invención, el anticuerpo frente a huTNFR1 comprende una etiqueta adicional que permite la interacción específica con un compuesto biológicamente aceptable. No hay una limitación específica respecto a la etiqueta que se puede usar en la presente invención, siempre que no tenga un impacto negativo o tenga uno tolerable en la unión del anticuerpo frente a huTNFR1 a huTNFR1 o la respuesta inmunogénica cuando se administra a un ser humano. Los ejemplos de etiquetas adecuadas incluyen etiqueta His, etiqueta Myc, etiqueta FLAG, etiqueta Strep, etiqueta Calmodulina, etiqueta GST, etiqueta MBP y etiqueta S.

10 Un "derivado" de un anticuerpo o molécula Fc se entiende en la presente memoria como cualquier combinación con uno o más péptidos, polipéptidos o dominios de proteína, tales como dominios de anticuerpo y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio del anticuerpo de la invención puede unirse o fusionarse en cualquier posición con una o más proteínas adicionales (tales como otros anticuerpos o dominios de anticuerpo, ligandos, enzimas, toxinas y semejantes). Un derivado del anticuerpo de la invención también puede obtenerse por asociación o unión a  
 15 otras sustancias por varias técnicas químicas tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática unión disulfuro etc. Otras sustancias unidas al anticuerpo pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de éstas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también comprendería un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos homóloga, que puede contener aminoácidos no naturales o modificados químicamente. Los derivados adicionales se proporcionan como fragmentos o variantes de anticuerpo.

20 El término "fragmento de anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier parte de un anticuerpo como se ha definido anteriormente siempre que tenga la capacidad de unirse a sitios de unión del antígeno deseado (huTNFR1). Además, un fragmento del anticuerpo según la presente invención comprende varias partes diferentes de dicho anticuerpo, en cualquier caso una región Fc.

25 El término "variantes" se referirá a mutantes, por ejemplo, obtenidos por métodos de mutagénesis dirigida a sitio, en particular para delecionar, intercambiar o introducir insertos en una región de anticuerpo específica, preferiblemente en los dominios constantes para modificar por ingeniería la función efectora o vida media del anticuerpo, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión a antígeno, por ejemplo, por técnicas de maduración de la afinidad. Puede emplearse cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluyendo mutaciones puntales en posiciones deseadas, por ejemplo, obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se  
 30 eligen aleatoriamente, por ejemplo, con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias de anticuerpo. El término "variante" se referirá específicamente a variantes funcionalmente activas.

35 El término "variante funcionalmente activa" de una molécula, tal como el anticuerpo tal y como se usa en la presente memoria, significa una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia por inserción, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos en la secuencia o en uno o los dos extremos distales de la secuencia, y dicha modificación no afecta (en particular, perjudica) la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de unión que tiene especificidad para un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de una

molécula todavía tendría la especificidad de unión predeterminada, aunque ésta podría cambiarse, por ejemplo, para cambiar la especificidad fina para un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, la velocidad Kasoc o Kdisoc, etc. En una realización preferida, la variante funcionalmente activa a) es un fragmento biológicamente activo de la molécula, comprendiendo el fragmento al menos 50% de la secuencia de la molécula, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% ó 99%; b) deriva de la molécula por al menos una sustitución, adición y/o delección de aminoácido, en el que la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia respecto a la molécula o parte de ésta, tal como un anticuerpo, de al menos 50% identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% ó 99%; y/o c) consiste en la molécula o una variante funcionalmente activa de ésta y adicionalmente al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo respecto a la secuencia de polipéptido o nucleótido, preferiblemente en la que la variante Fc funcionalmente activa deriva de cualquiera de las variantes naturales de Fc de IgG humana (SEQ ID No:9):

TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Las variantes de Fc funcionalmente activas pueden obtenerse cambiando la secuencia anterior y se caracterizan por tener una actividad biológica similar a la presentada por la secuencia respectiva, incluyendo la capacidad de estabilizar un anticuerpo o de conferir una vida media prolongada. Las variantes de Fc preferidas tal y como se usan en un anticuerpo según la invención comprenden mutaciones para reducir la función efectora de Fc.

Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse por alteraciones de la secuencia en la secuencia de polipéptido o nucleótido, en la que las alteraciones de la secuencia retienen una función de la secuencia de polipéptido o nucleótido no alterada, cuando se usa en combinación de la invención. Dichas alteraciones de la secuencia pueden incluir, pero no están limitadas a, sustituciones (conservativas), adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones.

En una realización preferida de la invención, la variante funcionalmente activa del anticuerpo según la invención es esencialmente idéntica a la variante descrita anteriormente, pero se diferencia de su secuencia de polipéptido o nucleótido, respectivamente, en que deriva de una secuencia homóloga de una especie diferente. Éstas se refieren como variantes naturales.

El término "variante funcionalmente activa" también incluye variantes alélicas naturales, así como mutantes o cualesquiera otras variantes no naturales. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección, o adición de uno o más aminoácidos que no altera esencialmente la función biológica del polipéptido.

Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Los ejemplos de dichas familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares no cargadas, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes etc.

El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido específica, después de alinear la secuencia e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "se une específicamente" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que es determinativa del ligando cognado de interés en una población heterogénea de moléculas. Así, en condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo), el anticuerpo según la invención se une a su diana particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad o avidéz alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva o específica se consigue habitualmente si la constante de unión o dinámicas de unión es al menos 10 veces diferente, preferiblemente, la diferencia es al menos 100 veces, y más preferido al menos 1.000 veces.



El término "anticuerpo" o "región Fc" incluirá específicamente aquellos mutantes o variantes funcionalmente activas con propiedades de unión a receptor de Fc deficientes, por ejemplo, regiones Fc preparadas por glicoingeniería o aquellas con función efectora modulada a la baja y/o vida media prolongada.

5 El término "función efectora" tal y como se usa para el propósito de la invención significaría el efecto mediado por la unión de un ligando efector a la región Fc de un anticuerpo. Los ligandos efectores ejemplares son receptores de Fc o moléculas semejantes a receptor de Fc que se unen a inmunoglobulinas. Un receptor de Fc es una proteína encontrada en la superficie de determinadas células-incluyendo células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, y mastocitos-que contribuyen a las funciones protectoras del sistema inmune. Hay varios tipos diferentes de receptores de Fc, que se clasifican tomando como base el tipo de anticuerpo que reconocen; aquellos que se unen a la clase más común de anticuerpo, IgG, se denominan receptores de Fc-amma (FcγR o FcγR). La familia de los FcγR incluye varios miembros: FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b). Entre las moléculas efectoras también hay proteínas del complemento, tales como C1q.

15 Otro receptor de Fc, el receptor de Fc neonatal (FcRn) también se une a IgG y está implicado en la conservación y vida media de este anticuerpo. Según la invención, se prefiere que la función mediada por FcRn no esté modulada a la baja.

20 El término "modular a la baja" se referirá a la reducción de un efecto mediado por un gen o grupo de genes, o un polipéptido, por mutación génica o regulación a la baja de la expresión génica o actividad de productos de expresión génica, tales como ácidos nucleicos o polipéptidos, específicamente por reducción de las propiedades de unión, como afinidad, avidéz o especificidad, incluyendo inhibición de la unión a un ligando, tal como un ligando efector, al menos en parte. De esta manera, puede obtenerse un anticuerpo que presenta una ADCC y/o CDC reducida.

25 La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), es la muerte de células diana recubiertas por anticuerpo por células con receptores de Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La mayor parte de ADCC está mediada por células NK que tienen el receptor de Fc FcγRIII o CD16 en su superficie. Los ensayos típicos emplean células diana, como células Ramos, incubadas con anticuerpo diluido de forma seriada antes de la adición de células efectoras recién aisladas. El ensayo ADCC se incubaba entonces además durante varias horas y se detecta el % de citotoxicidad. Habitualmente, la relación Diana:Efector es aproximadamente 1:16, pero puede ser 1:1 hasta 1:50.

30 La citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) es un mecanismo de matar células en el que el anticuerpo unido a la superficie de la célula diana fija complemento, lo que resulta en el ensamblaje del complejo de ataque de la membrana que hace agujeros en la membrana de la célula diana lo que resulta en la lisis celular posterior. El ensayo CDC usado comúnmente sigue el mismo procedimiento que para la determinación de ADCC, sin embargo, con suero que contiene complemento en lugar de células efectoras.

35 El anticuerpo según la invención tiene una región Fc deficiente en la mediación de funciones efectoras, preferiblemente una actividad citotóxica modulada a la baja según se determina bien por el ensayo ADCC o CDC, preferiblemente de una manera que proporciona una disminución significativa en el porcentaje de citólisis comparado con un control. El porcentaje absoluto de disminución es preferiblemente mayor de 10%, más preferiblemente mayor de 20%, incluso más preferido mayor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Lo más preferiblemente, el anticuerpo carece esencialmente de al menos una de actividad ADCC o CDC, por ejemplo, tiene menos de 10% de la actividad ADCC y/o CDC típica comparado con un anticuerpo nativo (no modificado). El término "carece esencialmente" tal y como se usa en la presente memoria también se referirá a aquellas variantes de anticuerpo que carecen completamente de dicha actividad según se mide en un ensayo estándar.

45 Las mutaciones puntuales específicas en la región Fc son muy conocidas en la técnica para modular a la baja efectivamente la función efectora. Específicamente, las mutaciones preferidas se emplean en la región del sitio de unión en IgG humana para los diferentes receptores Fcγ (FcγR), que proporcionarían la supresión del reclutamiento inmune a través de FcγR. El sitio de unión en IgG humana y murina para FcγR se mapeó principalmente en la región bisagra inferior compuesta por los residuos de IgG 233-239. Los segmentos más amplios adicionales, por ejemplo, Gly316-Lys338 se determinaron para FcγRI humano, Lys274-Arg301 y Tyr407-Arg416 para FcγRIII humano. La estructura de cristal 3,2-Å del fragmento Fc de IgG1 humana con FcγRIIIA humano delineó los residuos de IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, y Ala327-Ile332 como implicados en la unión a FcγRIIIA. Una revisión referente a mapeo de alta resolución de IgG1 humana para los receptores FcγR humanos (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIIA) se proporciona por Shields et al (J Biol Chem. 2001 mar 2;276(9):6591 -604. Epub 2000 nov 28).

50 El término "mutaciones puntuales" tal y como se usa en la presente memoria se referirá a la sustitución de una única base, en la que un nucleótido de única base se reemplaza con otro nucleótido del material genético, ADN o ARN.

55 Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo según la invención es según el índice Kabat EU.

La región Fc tal y como se usa según la invención puede estar glicosilada o no, dependiendo de las mutaciones específicas o la elección del sistema de expresión.

El término "preparado por glicoingeniería" respecto a secuencias de anticuerpo o región Fc se referirá a variantes de glicosilación que tienen ADCC y/o CDC modificada como resultado de la glicoingeniería. Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, poseyendo cada isotipo una disposición distinta de estructuras de carbohidrato unidas por N, que afectan de forma variable el ensamblaje, secreción o actividad funcional de la proteína. Los anticuerpos de tipo IgG1 son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido por N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantena complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con el núcleo del polipéptido, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995)). La eliminación del N-Glicano en N297, por ejemplo, a través de la mutación de N297, por ejemplo, a A, o T299 resulta típicamente en un Fc aglicosilado con ADCC reducida.

Se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada creciendo en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas proporciona típicamente un anticuerpo aglicosilado que carece esencialmente de actividad ADCC y/o CDC.

El anticuerpo según la invención se conjuga preferiblemente con un marcador o molécula informadora, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de éstos. Los anticuerpos conjugados con marcadores o moléculas informadoras pueden usarse, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos de diagnóstico.

El anticuerpo según la invención puede conjugarse con otras moléculas que permiten la detección sencilla de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

Los métodos para producir y caracterizar un anticuerpo según la invención son muy conocidos en la técnica. En una realización preferida, se producen y criban variantes de anticuerpo para propiedades predefinidas usando uno o más ensayos basados en células que emplean células que expresan huTNFR1 o ensayos *in vivo*. Para dichos ensayos, el anticuerpo se añade típicamente exógenamente de manera que dichas células pueden unirse, por ejemplo, en presencia y ausencia de TNFalfa para determinar la actividad antagonista y agonista. Estos ensayos se basan típicamente en la función de la inmunoglobulina; esto es, la capacidad del anticuerpo de unirse a huTNFR1 y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo, el bloqueo de la unión de TNFalfa a dichas células, por ejemplo, en un ensayo de unión competitiva, inhibición de la unión TNF/receptor, la reducción de la expresión de citoquinas en presencia o ausencia de TNF, específicamente interleuquinas inflamatorias, tales como IL6 o IL8, apoptosis, y semejantes.

Dichos ensayos implican frecuentemente la monitorización de la respuesta de células al anticuerpo, por ejemplo, supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o gen informador. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, esto es, además de las células diana, por ejemplo, complemento sérico, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y semejantes. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente seres humanos, ratones, rata, conejo, y mono.

Los métodos para monitorizar la muerte o viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos, y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción de caspasas pueden permitir medir la apoptosis, y la captación o liberación de sustratos radiactivos o colorantes fluorescentes tales como azul de alamar puede permitir monitorizar el crecimiento o activación celular.

La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede monitorizarse ensayando genes naturales o inmunoglobulinas que pueden estar regulados al alza, por ejemplo, puede medirse la liberación de determinadas interleuquinas, o alternativamente la lectura puede ser a través de una construcción informadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medida de cambios morfológicos de células como una respuesta a la presencia de un anticuerpo según la invención.

El anticuerpo de la presente invención tiene preferiblemente una actividad antagonista de TNF, reduciendo la reacción inflamatoria causada por un nivel incrementado de TNFalfa en la circulación que podría resultar en respuestas inflamatorias no deseadas, apoptosis y necrosis. El anticuerpo preferido tiene una actividad antagonista correspondiente a una  $CI_{50}$  de menos de 100nM, preferiblemente menos de 20nM, más preferido menos de 10nM, lo más preferido en el intervalo de un único dígito nanomolar o menos, según se mide en un ensayo basado en células que emplea TNF a una concentración mitad de la máxima de saturación, preferiblemente en el intervalo de 1-100nM de TNF, por ejemplo, por un sistema de ensayo como se describe adicionalmente por los ejemplos siguientes.

La actividad agonista que mimetiza TNF se mide preferiblemente en el mismo ensayo basado en células, sin embargo, sin emplear TNF, por ejemplo, por un sistema de ensayo como se describe adicionalmente por los ejemplos siguientes. El anticuerpo de la invención preferiblemente no tiene actividad agonista significativa, si la

incubación de células HeLa o HT1080 en ausencia de TNF resulta sólo en la inducción marginal de citoquina, por ejemplo, niveles elevados de IL6 o IL8 de menos de 0,5ng/ml a concentraciones de al menos 5nM o alrededor de 10nM. Preferiblemente, había producción marginal o negativa de citoquinas, que puede determinarse por la cantidad de menos de 10pg/10<sup>5</sup> células. En un ejemplo preferido, la expresión y liberación de citoquinas fue menos de 2,5pg/100.000 células en 18h. Preferiblemente, la actividad agonista es así menor de 10% de la respuesta de una concentración comparable de TNF, preferiblemente menor de 5% de la respuesta equivalente de TNF.

Se ha demostrado particularmente que un anticuerpo ejemplar según la invención no desencadenaba la expresión o liberación de citoquinas inflamatorias, tales como IL6 o IL8. De esta manera, las condiciones inflamatorias o daño tisular no deseado pueden evitarse. La citotoxicidad adicional no deseable que podría haberse causado por la función efectora de Fc se reduce a un mínimo. La reducción de dichas reacciones secundarias es particularmente útil para proporcionar preparaciones farmacéuticas para tratar enfermedades crónicas.

El anticuerpo de la invención se proporciona preferiblemente como una proteína recombinante producida por un sistema de expresión recombinante empleando una célula huésped, por ejemplo, por la expresión en el espacio periplásmico de E. coli o por expresión como una proteína secretada en un sistema de expresión eucariota tal como levadura o mamífero, por ejemplo, por líneas celulares huésped de producción CHO, HEK o humanas.

El término "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia codificadora deseada y secuencias control en unión operativa, de manera que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Con el fin de efectuar la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede integrarse en el cromosoma del huésped. Alternativamente, puede usarse un sistema de expresión para la transcripción/traducción *in vitro*.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se han usado lo más comúnmente para la producción de anticuerpos. Además de proporcionar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales genéticamente estables, altamente productivas. Éstas pueden cultivarse hasta altas densidades en biorreactores sencillos usando medios sin suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles.

Las células huésped son las más preferidas, cuando están establecidas, adaptadas, y completamente cultivadas en condiciones sin suero, y opcionalmente en medios que carecen de cualquier proteína/péptido de origen animal.

Una composición farmacéutica preferida según la invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo frente a huTNFR1 como se ha definido anteriormente y opcionalmente uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en un vehículo farmacéuticamente aceptable, sales farmacéuticamente aceptables, un agente auxiliar, un estabilizador, un diluyente y un disolvente, o cualquier combinación de éstos.

Según la invención, un método para tratar a un paciente comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo frente a huTNFR1 definido anteriormente a un paciente que lo necesita. Una cantidad terapéuticamente efectiva está típicamente en el intervalo de 0,5-500mg, preferiblemente 1-400mg, incluso más preferido hasta 300mg, hasta 200mg, hasta 100mg o hasta 10mg, aunque pueden indicarse dosis más altas, por ejemplo, para tratar afecciones patológicas agudas.

En una realización, un anticuerpo según la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, el anticuerpo según la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero no limitado a, antagonistas de TNFalfa, agentes anti-inflamatorios, citoquinas, factores de crecimiento, u otros agentes terapéuticos. El anticuerpo antagonista de TNF puede administrarse concomitantemente o consecutivamente con uno o más regímenes terapéuticos adicionales, preferiblemente con terapéuticos anti-TNF, tales como anticuerpos anti-TNF. El anticuerpo de la presente invención se administra preferiblemente al paciente como una terapia de segunda línea en la que los terapéuticos anti-TNF no fueron eficientes, bien como tratamiento agudo o crónico. El uso médico específicamente preferido es para tratar enfermedades crónicas.

Las indicaciones preferidas están relacionadas típicamente con indicaciones de un terapéutico anti-TNF y el anticuerpo de la presente invención se usa como una alternativa a terapéuticos anti-TNF convencionales.

Específicamente, la composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para tratar enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn (Morbus Crohn), esclerosis múltiple, fallo cardíaco congestivo, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda y crónica, incluyendo ictus, enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Las indicaciones apropiadas adicionales incluyen colitis ulcerosa y otras enfermedades crónicas inflamatorias y/o autoinmunes, infecciones virales o bacterianas agudas fulminantes, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, enfermedades heredadas genéticamente con TNF/TNFR1 como el mediador patológico causal, preferiblemente seleccionadas de síndrome febril periódico y Cherubismo, y cáncer.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan el anticuerpo de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables del anticuerpo de la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. El anticuerpo y otros agentes terapéuticamente activos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas, y/o atrapados en microcápsulas.

La composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención, preferiblemente en la forma de una disolución acuosa estéril, puede administrarse de una variedad de formas, incluyendo, pero no limitado a, subcutáneamente, intravenosamente, oralmente, intranasalmente, intraóticamente, transdérmicamente mucosal, tópicamente (por ejemplo, geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, parenteralmente, rectalmente o intraocularmente.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los ejemplos siguientes. Dichos ejemplos son, sin embargo, meramente representativos de métodos para llevar a la práctica una o más realizaciones de la presente invención.

### Ejemplo

#### Materiales

El anticuerpo anti-IgG de ratón (específico de Fc) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), anticuerpos anti-IgG humana (molécula completa, específico de Fc, específico de Fab) conjugados con HRP, respectivamente, se adquirieron en Sigma (Taufkirchen, Alemania). Los anticuerpos anti-ratón (molécula completa) y anti-IgG humana (específico de la cadena  $\gamma$ ) marcados con PE, respectivamente, se adquirieron en Sigma (Taufkirchen, Alemania). Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) transfectados con TNFR1-Fas (MEF-TNFR1-Fas) y TNFR2-Fas (MEF-TNFR2-Fas), respectivamente, se crecieron en medio RPMI 1640, 5% FCS, 2 mM L-glutamina, 2  $\mu$ g/ml puomicina. La línea celular de rhabdomiosarcoma humano, Kym-1, se creció en medio RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-glutamina y las células HT1080wt y células HeLa se crecieron en medio RPMI 1640, 5% FCS, 2 mM L-glutamina.

#### Producción de IgG IZI-06.1 (ATROSAB)

El ADN que codifica la cadena ligera y pesada de ATROSAB incluyendo las secuencias señal Igk y optimizado por codones para la producción en células CHO se produjo sintéticamente empleando la información de secuencia de WO2008/113515A2 (Geneart, Regensburg, Alemania). El ADN de la cadena ligera (LC) se clonó como fragmento BamHI/NotI en el vector lanzadera pCV072 (Celonic GmbH, Julich, Alemania) y el ADN de la cadena pesada (HC) se clonó como fragmento KasI/NheI en pFUSE (InvivoGen, Toulouse, Francia). La región Fc codificada por pFUSE se cambió para reconstituir el alotipo preferido correcto G1m1,17 (E356D, M358L, G431A). pFUSE-HC se digirió con SmaI (Swal) y el fragmento con extremo romo resultante que contenía el casete de expresión completo de HC se clonó en pCV072-LC digerido con PstI. En este casete de expresión bicistrónico, la cadena ligera está bajo el control del promotor PHEF1-HTLV y el gen de la cadena pesada está controlado por el promotor potenciado PCMV.

Las células CHO transfectadas de forma estable se crecieron en CDM4PermAB (ThermoFischer, Erembodegem, Bélgica) y se cultivaron en modo discontinuo en un sistema de biorreactor wave de 25L (Sartorius Stedim, Melsungen, Alemania) con una disolución de alimentación de hidrolizado de soja (Kerry Biosciences, Almere, Holanda). El anticuerpo se purificó del sobrenadante del cultivo celular usando cromatografía de proteína A (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) seguida de una etapa intermedia de membrana con Sartobind Q single Sep mini (Sartorius Stedim, Melsungen, Alemania). El producto final se obtuvo mediante una etapa de intercambio de tampón.

#### Producción de proteínas de fusión TNFR1-Fc

El ADN que codifica la región extracelular de TNFR1 humano (aa 29-211), TNFR1 de rhesus (aa 27-209), y TNFR1 de ratón (aa 30-212) se produjo sintéticamente (Geneart, Regensburg, Alemania) usando la información de secuencia de UniProtKB (Swiss-Prot) entrada P19438 (TNFR1 humano (Homo sapiens)), introduciendo sitios de restricción apropiados entre los dominios individuales, y se clonó en pSecTagL1-Fc (modificado de pSecTag-FcHis, (Muller et al. J. Immunol. Methods (2008) 339(1): 90-8)). Las proteínas de fusión quiméricas TNFR1-Fc humano/de ratón se generaron por intercambio de las diferentes regiones entre TNFR1-Fc humano y de ratón. Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico usando lipofectamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y los clones transfectados de manera estable se seleccionaron en presencia de zeocina como se describe (Muller et al. J. Biol. Chem (2007) 282(17): 12650-60). Las células se expandieron en RPMI, 5 % FCS, 2 mM L-glutamina hasta el 90 % de confluencia. Para la producción de proteínas, el medio se sustituyó con Opti-MEM I (Invitrogen, Karlsruhe Alemania) y el sobrenadante se recogió cada 3-4 días. Las proteínas se purificaron del sobrenadante del cultivo celular por cromatografía de proteína A. Brevemente, los sobrenadantes se ajustaron a pH 8 añadiendo 1/10 volumen de 1 M TrisHCl pH 8,0 y se cargaron en una columna de proteína A-sefarosa CL-4B (Sigma, Taufkirchen, Alemania). La proteína unida se eluyó con 100 mM glicina pH 3,0, se neutralizó añadiendo 1/10 de volumen de 1 M TrisHCl pH 8,0 y las fracciones que contenían la proteína se dializaron frente a PBS. Las concentraciones de

proteína se determinaron fotométricamente y la pureza se analizó por SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti IgG (específico de Fc) conjugado con HRP (Sigma, Taufkirchen, Alemania).

#### Caracterización de las proteínas

5 Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) por HPLC usando un BioSuite™ 250, 5 µm HR SEC (Waters GmbH, Eschborn, Alemania). Se usaron las proteínas estándar siguientes: apoferritina (443 kDa), β-amilasa (200 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), aprotinina (6,5 kDa).

#### Medidas de afinidad

10 Las afinidades de los anticuerpos se determinaron por medidas de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM; sistema Attana A-100 C-Fast, Estocolmo, Suecia). Los experimentos de unión se llevaron a cabo en PBS 0,005 % Tween 20 a una velocidad de flujo de 25 a 35 µl/min y la temperatura se controló a 20°C. Las proteínas de fusión TNFR1-Fc se inmovilizaron químicamente en un chip sensor de carboxilo Attana por acoplamiento de amina, a una concentración de 50 µg/ml según el protocolo del fabricante resultando en un incremento de la señal (desplazamiento de frecuencia) de aproximadamente 200 Hz. Los anticuerpos se analizaron a concentración entre 62,5 y 3,9 nM (4 medidas por concentración). El chip se regeneró con 10 mM glicina-HCl, pH 3,0. Las inyecciones de tampón se  
15 llevaron a cabo antes de la inyección de cada muestra para uso como una referencia en la Evaluación Attester. Se recogieron los datos por Attester 3.0 (Versión 3.1.1.8, Attana, Estocolmo, Suecia) y se analizaron por ClampXP (Myszka y Morton 1998). Un modelo de transporte de masa (Myszka 1997) se ajustó a los datos.

#### ELISA

20 La proteína de fusión TNFR1-Fc recombinante humana se inmovilizó en placas de 96 pocillos (50 ng/pocillo en PBS) toda la noche a 4°C. Después de 2 h de bloqueo con 2% (p/v) leche seca /PBS, los fragmentos de anticuerpo recombinante se titularon en duplicado y se incubaron durante 1 h a RT. La detección se llevó a cabo con anticuerpo anti-IgG humana (específico de Fab) conjugado con HRP y anti-IgG de ratón (específica de Fc) conjugada con HRP usando sustrato TMB (1 mg/ml TMB, tampón acetato de sodio pH 6,0, 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La reacción se paró con 50 µl de 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector ELISA.

#### 25 Citometría de flujo

La unión a células MEF transfectadas con TNFR1-Fas o TNFR2-Fas se analizó por citometría de flujo. Las células (2 x 10<sup>5</sup>) se incubaron con series de dilución de anticuerpos durante 4 h a 4°C. Las células se lavaron con PBS y los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo de cabra marcado con PE anti-ratón o anti-humano. Las células se analizaron por citometría de flujo (Cytomics FC 500, Beckmann-Coulter, Krefeld, Alemania). Los datos se evaluaron  
30 con el programa WinMDI, versión 2.9, y se ajustaron con software GraphPrism (La Jolla, EEUU) a partir de 3 curvas de unión independientes.

#### Citotoxicidad

35 Las células Kym-1 (1,5 x 10<sup>4</sup> células/100 µl) se crecieron en placas de 96 pocillos toda la noche. Se aplicó una cantidad constante de TNFalfa soluble humano (1,25 ng/ml en medio) después de preincubación con anticuerpos en triplicado (concentraciones como se indica en las figuras) en medio durante 1 h. Después de 7 h, las células se tiñeron con cristal violeta (20% metanol, 0,5 % cristal violeta) durante 15 min. Los pocillos se lavaron con H<sub>2</sub>O y se secaron al aire. La tinción se resolvió con metanol durante 15 min y se determinó la densidad óptica a 550 nm (Tecan infinite M200, Crailsheim, Alemania).

#### Ensayos de IL-6 e IL-8

40 Se crecieron células HT1080 (2,0 x 10<sup>5</sup> células/100 µl) en placas de 96 pocillos toda la noche. Al día siguiente, el medio se intercambiaba para eliminar IL-8 producida constitutivamente y las células se incubaron en duplicado junto con diluciones seriadas de TNF soluble humano durante 18 h adicionales. La inducción de la producción y secreción de IL-8 en el sobrenadante de cultivo se determinó por un ELISA en sandwich de IL-8 (ImmunoTools, Friesoythe, Alemania) según el protocolo del fabricante. Además, las células se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos en presencia de TNFalfa (constante 1 ng/ml) y se analizaron para secreción de IL-8 después de 18 h de incubación. De la misma manera, analizamos los efectos inhibidores de los anticuerpos en la secreción de IL-6  
45 mediada por TNF de células HeLa usando un ELISA en sandwich de IL-6 (ImmunoTools, Friesoythe, Alemania) según el protocolo del fabricante. La actividad agonista se midió en ausencia de TNF.

#### Actividad CDC: Unión a C1q

50 La ausencia de actividad agonista de ATROSAB también se ha demostrado en el ensayo de unión a C1q estándar. C1q es el primer subcomponente del complejo C1 de la ruta clásica de activación del complemento, que también está implicada en la lisis celular. Así, la unión de compuestos a C1q dará lugar a la activación del complemento y posteriormente a la lisis celular. En los experimentos llevados a cabo, la inmunoglobulina Herceptina (trastuzumab, Roche), que se sabe que induce la lisis celular y se usa para el tratamiento de cáncer metastásico de mama y

gástrico, se usó como un control positivo; la inmunoglobulina G2a como un control negativo. Como se muestra en la Fig 11, ATROSAB no se une significativamente a C1q, lo que está en claro contraste con el antagonista del receptor de TNF no selectivo Remicade (Infliximab, Centocor, Inc.), que se usó como comparador en el estudio. Estos resultados confirman que Atrosab no induce citotoxicidad dependiente de complemento.

## 5 Resultados

### Producción y actividad de unión de IgG IZI-06.1 (ATROSAB)

El Fab anti-TNFR1 humano humanizado IZI-06.1 (WO2008/113515) se convirtió en una IgG1 humana usando una cadena pesada con funciones efectoras suprimidas (Fc preparada por ingeniería IgG1e3 por InvivoGen, San Diego California; secuencia de hlgG1e3-Fc1 que tiene la secuencia de Fc humano (SEQ ID NO: 9) con sustituciones E233P/L234V/L235A/ $\Delta$ G236 y A327G/A330S/P331S. La información de la secuencia se proporciona en la Figura 9 (SEQ ID NO: 10-18).

Este anticuerpo (ATROSAB) se produjo en células CHO. Se llevó a cabo una producción a escala de 25L de ATROSAB en un sistema wave durante un periodo de 15 días con una densidad celular máxima de más de 12 millones de células/mL. La pureza e integridad se confirmaron por análisis por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño (Fig. 1a, b). ATROSAB mostró una fuerte unión a TNFR1-Fc recombinante humano compuesto por la región extracelular de TNFR1 fusionada a la región Fc de IgG1 humana (Fig. 1c). El anticuerpo parental, H398, presentó una unión idéntica en ELISA. La selectividad para TNFR1 se confirmó por análisis de citometría de flujo de ATROSAB usando fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) transfectados con proteínas de fusión que comprendían el dominio extracelular de TNFR1 y TNFR2, respectivamente, fusionados con el dominio intracelular de Fas humano (TNFR1-Fas; TNFR2-Fas) (Krippner-Heidenreich et al. J. Biol. Chem. (2002) 277(46): 44155-63). En este ensayo, la unión sólo se observó con MEF-TNFR1-Fas pero no con MEF-TNFR2-Fas (Fig. 2a, b). La unión de ATROSAB a MEF-TNFR1-Fas fue comparable a la de H398 como se muestra por una titulación de la concentración de anticuerpo (Fig. 2c). Los valores CE50 fueron aproximadamente 0,1 nM tanto para ATROSAB como H398. A continuación, investigamos la especificidad de especie con las proteínas de fusión recombinantes TNFR1-Fc de ratón y TNFR1-Fc de rhesus. En ELISA, la unión de los dos anticuerpos se observó para TNFR1-Fc humano y de rhesus, pero no para TNFR1-Fc de ratón (Fig. 3b).

### Medidas de afinidad

La afinidad de ATROSAB para TNFR1 se determinó por medidas de microbalanza de cristal de cuarzo usando TNFR1-Fc inmovilizado. El ATROSAB se unió con afinidad sub-nanomolar a TNFR1 Fc humano y de rhesus, similar a la afinidad de H398 para TNFR1-Fc humano y TNFR1-Fc de rhesus (Fig. 4, Tabla 1). Se midió una afinidad reducida aproximadamente 10 veces para scFv IZI-06.1 monovalente, debido a una velocidad de disociación más rápida, indicando que la unión de ATROSAB y H398 a las proteínas de fusión dimericas TNFR1-Fc están influida por efectos de avididad.

Tabla 1: Cinéticas de unión de H398 y ATROSAB

anticuerpo	antígeno	R <sub>max</sub> (Hz)	k <sub>asoc</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>disoc</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)
H398	huTNFR1-Fc	45,4	3,1 x 10 <sup>5</sup>	7,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,3 x 10 <sup>-10</sup>
H398	rheTNFR1-Fc	30,4	2,1 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>-4</sup>	4,9 x 10 <sup>-10</sup>
ATROSAB	huTNFR1-Fc	46,6	3,8 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>-4</sup>	3,5 x 10 <sup>-10</sup>
ATROSAB	rheTNFR1-Fc	34,9	6,9 x 10 <sup>5</sup>	6,7 x 10 <sup>-5</sup>	1,0 x 10 <sup>-10</sup>
scFv IZI-06.1	huTNFR1-Fc	7,2	3,5 x 10 <sup>5</sup>	7,6 x 10 <sup>-4</sup>	2,2 x 10 <sup>-9</sup>

35

### Actividad antagonista de ATROSAB

ATROSAB inhibió de una manera dependiente de la dosis la apoptosis inducida por TNF de células Kym-1 (Fig. 5). En este ensayo, se usó una concentración de TNF que resultó en un 90% de citotoxicidad. Aproximadamente una citotoxicidad mitad de la máxima, es decir, 55% de células viables, se observó a 60 nM para ATROSAB y 8 nM para H398, respectivamente. Entonces, investigamos los efectos de ATROSAB en la secreción inducida por TNF de IL-6 de células HeLa e IL-8 de células HT1080, respectivamente. TNF indujo una fuerte secreción de IL-6 de células HeLa de una manera dependiente de la dosis, alcanzando aproximadamente 700 pg/ml de IL-6 después de incubación con 4 nM TNF (200 ng/ml) durante 18 h. De forma similar, TNF indujo la secreción de IL-8 de células HT1080 alcanzando aproximadamente 7.000 pg/ml después de incubación con 4 nM TNF durante 18 h (Fig. 6c, d). ATROSAB y H398 inhibieron la liberación de IL-6 de células HeLa e IL-8 de células HT1080 inducidas por 20 pM TNF (1 ng/ml) de una manera dependiente de la dosis (Fig. 6a, b). En estos ensayos, los valores CI<sub>50</sub> fueron 60 nM para ATROSAB y 6 nM para H398 para la inhibición de la liberación de IL-6 (Fig. 6a) y para la inhibición de la

liberación de IL-8 (Fig. 6b), respectivamente. La incubación de células HeLa o células HT1080 (en ausencia de TNF) con ATROSAB y H398, respectivamente, resultó sólo en una inducción marginal de la liberación de citoquinas a un intervalo muy estrecho de dosis. Sólo a concentraciones alrededor de 10 nM, se observaron niveles ligeramente elevados de IL-6 (40 a 60 pg/ml frente a 15 pg/ml de las células no tratadas, es decir, 25-45 pg/ml inducidos), correspondiente a 3-4,5 % de la respuesta a una concentración comparable de TNF (4 nM). Para IL-8, el nivel se incrementó desde 80 pg/ml de las células no tratadas hasta aproximadamente 200 pg/ml después de incubación con los anticuerpos, correspondiente a aproximadamente 2% de la respuesta equivalente de TNF. La IgG humana incluida como control negativo no tuvo efecto en la liberación de citoquinas.

#### Vida media plasmática

- 10 La vida media de ATRSOAB y H398 se determinó después de una única inyección de dosis i.v. en ratones CD1. Las concentraciones de los anticuerpos durante un período de 7 días se midieron por ELISA, es decir, detectando moléculas de anticuerpo funcionales. Ambos anticuerpos mostraron una eliminación similar de la sangre con vidas medias terminales de  $10,5 \pm 2,8$  d para ATROSAB (n = 2) y  $8,1 \pm 1,5$  d para H398 (n = 3) (Fig. 7).

#### Mapeo de epítomos

- 15 Como H398 y ATROSAB no se unen a TNFR1 de ratón, aplicamos una estrategia de intercambio de dominios para el mapeo de epítomos (Fig. 8). La unión a estas moléculas quiméricas TNFR1-Fc se analizó por ELISA. Todas las construcciones fueron capaces de unir TNF humano, aunque las construcciones 3 y 4 mostraron una unión ligeramente reducida comparadas con las demás construcciones, no obstante, demostrando que las moléculas quiméricas retenían la actividad de unión a ligando. No se observó unión de ATROSAB y H398 con moléculas quiméricas en las que la CRD1 y 2 humana (construcción 3) o sólo la CRD1 se sustituyó por los dominios de ratón correspondientes (construcción 4). Además, no se observó unión cuando sólo el dominio A1 de CRD1 de TNFR1 humano se intercambió con la secuencia de ratón correspondiente (construcción 5). La unión se redujo fuertemente, también, con TNFR1 de ratón que contenía la CRD1 humana (construcción 7) o el dominio A1 humano de CRD1 (construcción 6), indicando que se requieren regiones adicionales para la unión completa. La extensión de la parte humana para incluir el sub-dominio A1 de CRD2 resultó en un TNFR1 quimérico frente al que H398 y ATROSAB muestran una fuerte unión (construcción 8). Así, el epítipo reside en la región N-terminal de TNFR1 abarcando los residuos 1 a 70. En esta región, 15 residuos son diferentes entre TNFR1 humano y TNFR1 de ratón, mientras sólo un residuo es diferente entre TNFR1 humano y de rhesus (Fig. 8b). Este residuo (Ile 21) está sustituido por una valina en TNFR1 de rhesus y de ratón. Varios de los residuos diferentes entre TNFR1 humano y de ratón están expuestos en el sitio de interacción del receptor con TNF, incluyendo Pro23, Gln24, Tyr30, Asn31, Ser57, Ser 59, His66, e His69. Con el fin de estrechar adicionalmente el epítipo, intercambiamos P23 y Gln24, localizados en el sub-dominio A1 de CRD1, por los residuos correspondientes de ratón en el TNFR1 h1-2A1/m2B2-4 quimérico (construcción 10, Fig. 8a, b). Estas mutaciones suprimieron completamente la unión de ATROSAB y H398 bajo las condiciones de ensayo aplicadas

#### 35 **Discusión**

Aquí describimos la generación de un derivado de IgG1 (ATROSAB) de un anticuerpo monoclonal humanizado antagonista específico de TNFR1. El formato IgG se eligió debido a su larga vida media, producción establecida y unión incrementada debido a bivalencia. ATROSAB posee una región Fc deficiente en la activación de ADCC y CDC.

- 40 La inhibición selectiva de receptor por ATROSAB y el anticuerpo de ratón parental resultaron en el bloqueo de distintas rutas de señalización de TNFR1, como se muestra por la inhibición de la muerte celular mediada por TNF y así como la liberación de IL-6 e IL-8 inducida por NF- $\kappa$ B. Ambas citoquinas son biomarcadores de inflamación y están elevadas, por ejemplo, durante episodios de enfermedad activa en artritis reumatoide. Se describió que la actividad antagonista del H398 murino y Fab monovalente humanizado estaba basada en la interferencia con la unión del ligando. Mediante el uso de una estrategia de intercambio de dominios para proteínas de fusión TNFR1-Fc quiméricas ratón/humano, mostramos que el epítipo reconocido por ATROSAB y H398 también incluye el subdominio A1 de CRD2, es decir, el epítipo total está abarcado por los aminoácidos 1 a 70 en la región N-terminal de TNFR1. El descubrimiento de que el subdominio A1 de CRD2 también se requiere para la unión del anticuerpo apunta hacia el bloqueo estérico como la causa de la neutralización de la acción de TNF. La estructura de TNFR1 con TNF unido (Fig. 7) muestra que la región de epítipo identificada se superpone al menos parcialmente con el sitio de unión de TNF que está localizado principalmente en CRD2 y CRD3. Adicionalmente, la mutagénesis dirigida a sitio reveló que los residuos Pro23 y Gln24 del subdominio A1 de CRD1 contribuyen directamente a la especificidad de antígeno y de especie. Esto es interesante ya que CRD1 no está implicado directamente en la unión del ligando, pero está implicado de forma crítica en la señalización de TNFR1. CRD1 controla la unión del ligando de alta afinidad mediante la estabilización de la conformación de la CRD2 subsecuente y la eliminación de CRD1 resulta en la pérdida de la unión del ligando. Además, CRD1 comprende un sitio de interacción homofílico receptor/receptor, el dominio de ensamblaje de unión pre-ligando (PLAD) que es esencial para la generación de complejos funcionales de señalización de TNFR. Por lo tanto, la unión de ATROSAB a CRD1 podría no sólo desplazar TNF por impedimento estérico o por la inducción de un cambio conformacional sino que también podría

interferir con las interacciones homotípicas PLAD, bloqueando de esta manera la formación de complejos funcionales de señalización de TNFR.

5 ATROSAB mostró una actividad antagonista ligeramente reducida comparado con H398. Esto no se debe probablemente a afinidad alterada ya que las afinidades de ambos anticuerpos para TNFR1 humano recombinante fueron similares según se determina por medidas de microbalanza de cristal de cuarzo y en medidas de citometría de flujo usando células que expresan TNFR1. Actualmente, no podemos excluir que ATROSAB y H398 se unan de una manera ligeramente diferente o a un área ligeramente diferente en la región identificada (aa 1-70) que contiene el epítipo. El mapeo de epítipo adicional por mutagénesis dirigida a sitio de residuos expuestos proporcionará conocimientos acerca de la localización exacta del epítipo conformacional de ATROSAB y H398 y el mecanismo del bloqueo del ligando.

10 En ausencia de TNF, para ambos anticuerpos (H398 y ATROSAB) se reveló una actividad estimuladora menor en un rango de dosis muy estrecho por ensayos sensibles *in vitro* con líneas celulares establecidas. Este efecto marginal de los anticuerpos bivalentes en la liberación de citoquinas podría estar causado por algún entrecruzamiento de receptores, porque para los fragmentos Fab monovalentes de ATROSAB y H398 en los mismos ensayos, no pudo discernirse ninguna actividad estimuladora sobre un intervalo de dosis de 4-log. Sin embargo, cuando se compara con la respuesta celular a tratamiento con TNF, esta actividad menor de los anticuerpos bivalentes parece despreciable, alcanzando niveles de pico hasta 2-5% de una respuesta genuina de TNF. Además, en células T de sangre periférica y granulocitos humanos recién aislados, no pudo discernirse ninguna actividad agonista de los anticuerpos específicos de TNFR1 en los modelos de respuesta celular dependientes de TNF de activación de células T y producción de O<sub>2</sub>, respectivamente.

15 De forma importante, pudimos demostrar la unión de ATROSAB a TNFR1 de rhesus con una afinidad similar que para TNFR1 humano, permitiendo así la evaluación *in vivo* de ATROSAB en monos rhesus. El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) es el estándar reconocido para terapéuticos potenciales de RA y podría inducirse de forma reproducible en macacos rhesus. Debido a la proximidad bien establecida (fisiológica, anatómica, genética, microbiológica e inmunológica) con los seres humanos, CIA en monos rhesus representa un modelo preclínico muy útil para la evaluación de la seguridad y eficacia de nuevas terapias y permite el análisis de la actividad neutralizante y seguridad de ATROSAB en primates no humanos.

20 El antagonista selectivo de TNFR1, tal como ATROSAB, permitirá nuevas opciones terapéuticas para enfermedades en las que los terapéuticos anti-TNF han fracasado o incluso exacerbado la progresión de la enfermedad, incluyendo esclerosis múltiple, fallo cardíaco congestivo, enfermedades metabólicas (diabetes tipo II), síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedades neurodegenerativas agudas (ictus) y crónicas (enfermedad de Alzheimer y Parkinson). ATROSAB podría ser una alternativa terapéutica especialmente útil en enfermedades que ya se sabe que responden clínicamente a tratamiento anti-TNF y particularmente en aquellas enfermedades en las que el bloqueo específico de TNFR1 y el mantenimiento de la función de TNFR2 aparece como una estrategia terapéutica prometedor.



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Baliopharm AG

5 <120> Anticuerpo anti-huTNFR1

<130> CE017P

<160> 19

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Secuencia CDR

20 <400> 1  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Ile Asn  
 1 5 10

<210> 2  
 25 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 30 <223> Secuencia CDR

<400> 2  
 Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Lys Ala 20

35 <210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 40 <213> artificial

<220>  
 <223> Secuencia CDR

45 <400> 3  
 Trp Asp Phe Leu Asp Tyr  
 1 5

<210> 4  
 <211> 18  
 50 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Secuencia CDR

55 <400> 4  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15  
 Trp Tyr

60 <210> 5  
 <211> 11

ES 2 618 586 T3

<212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 5  
 Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5 10

10 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia CDR

<400> 6  
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr  
 1 5

20 <210> 7  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <223> VH

<400> 7  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser  
 115

35 <210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> VL

ES 2 618 586 T3

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

- 5 <210> 9
- <211> 223
- <212> PRT
- <213> humano

10 <400> 9

ES 2 618 586 T3

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 35 40 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 115 120 125

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215 220

<210> 10  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> cadena pesada

10

<400> 10

ES 2 618 586 T3

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

ES 2 618 586 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 11  
<211> 115  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> VH

10 <400> 11

ES 2 618 586 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser  
115

<210> 12  
<211> 103  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
10 <223> CH1

<400> 12  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
100

15 <210> 13  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> artificial

ES 2 618 586 T3

<220>

<223> secuencia bisagra

5

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly  
1 5 10 15

<210> 14

<211> 103

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CH2

15

<400> 14

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
20 25 30

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
100

<210> 15

20

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25

<223> CH3

<400> 15



ES 2 618 586 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
100 105

<210> 16  
<211> 219  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
10 <223> cadena ligera

<400> 16  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

ES 2 618 586 T3

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 17  
<211> 113  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> VL

10

<400> 17  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

ES 2 618 586 T3

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 18  
<211> 106  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> CL

10 <400> 18  
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

15 <210> 19  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> humano

ES 2 618 586 T3

<400> 19

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

Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys  
          20                   25                   30

Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln  
          35                   40                   45

Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu  
          50                   55                   60

Asn His Leu Arg His Cys  
65                   70

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo anti-receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano (huTNFR1) del tipo IgG1, que tiene una región Fc modificada deficiente en la mediación de la función efectora, que es un anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de CDR identificadas por SEQ ID 1-6, y la secuencia Fc humana identificada por SEQ ID 9 que comprende al menos una mutación para modular a la baja la función efectora seleccionada del grupo que consiste en E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la región Fc está modificada por glicoingeniería para modular a la baja la función efectora.
- 10 3. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 ó 2, que se une específicamente a un epítipo que comprende la CDR1 distal de membrana y el subdominio A1 de CDR2 de huTNFR1.
4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se une específicamente a un epítipo representado por los aminoácidos 1 a 70 en la región N-terminal de huTNFR1.
5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se une específicamente a huTNFR1 por al menos dos sitios de unión, en el que la unión es
  - 15 a) bivalente, unión al mismo antígeno o epítipo por dos valencias; o
  - b) biespecífica, unión a dos antígenos o epítopos diferentes.
6. Preparación farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Método para producir un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 empleando un sistema de expresión de mamífero recombinante.
8. Método según la reivindicación 7, en el que se emplea una línea celular de producción CHO.
9. Anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de inflamación crónica no infecciosa de las articulaciones, piel e intestino.
- 25 10. Anticuerpo para uso según la reivindicación 9, como un tratamiento de segunda línea cuando los terapéuticos anti-TNF o DMARD no biológicos han fracasado.
- 30 11. Anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, fallo cardiaco congestivo, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda y crónica, incluyendo ictus, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, o cáncer.

Fig. 1

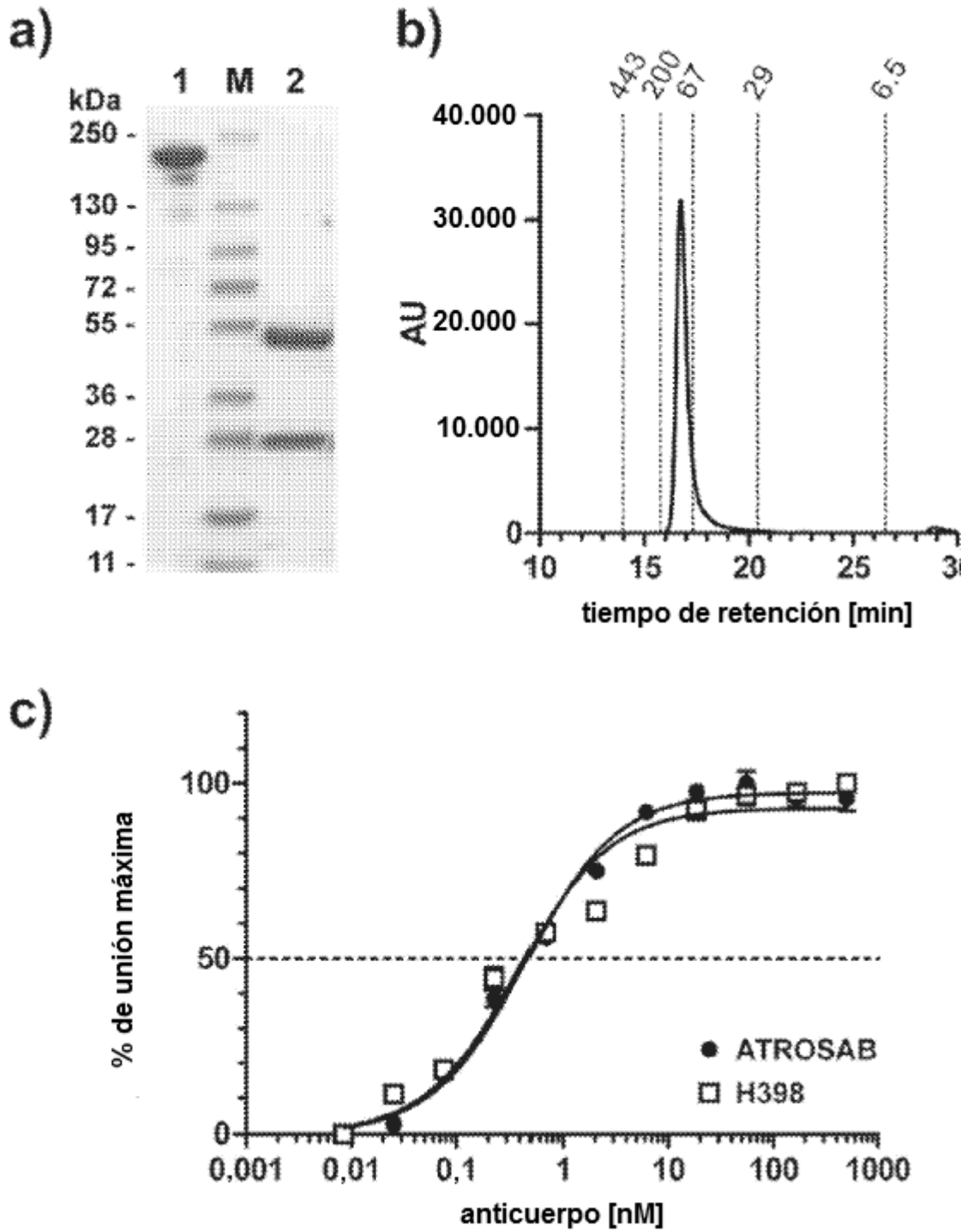


Fig. 2

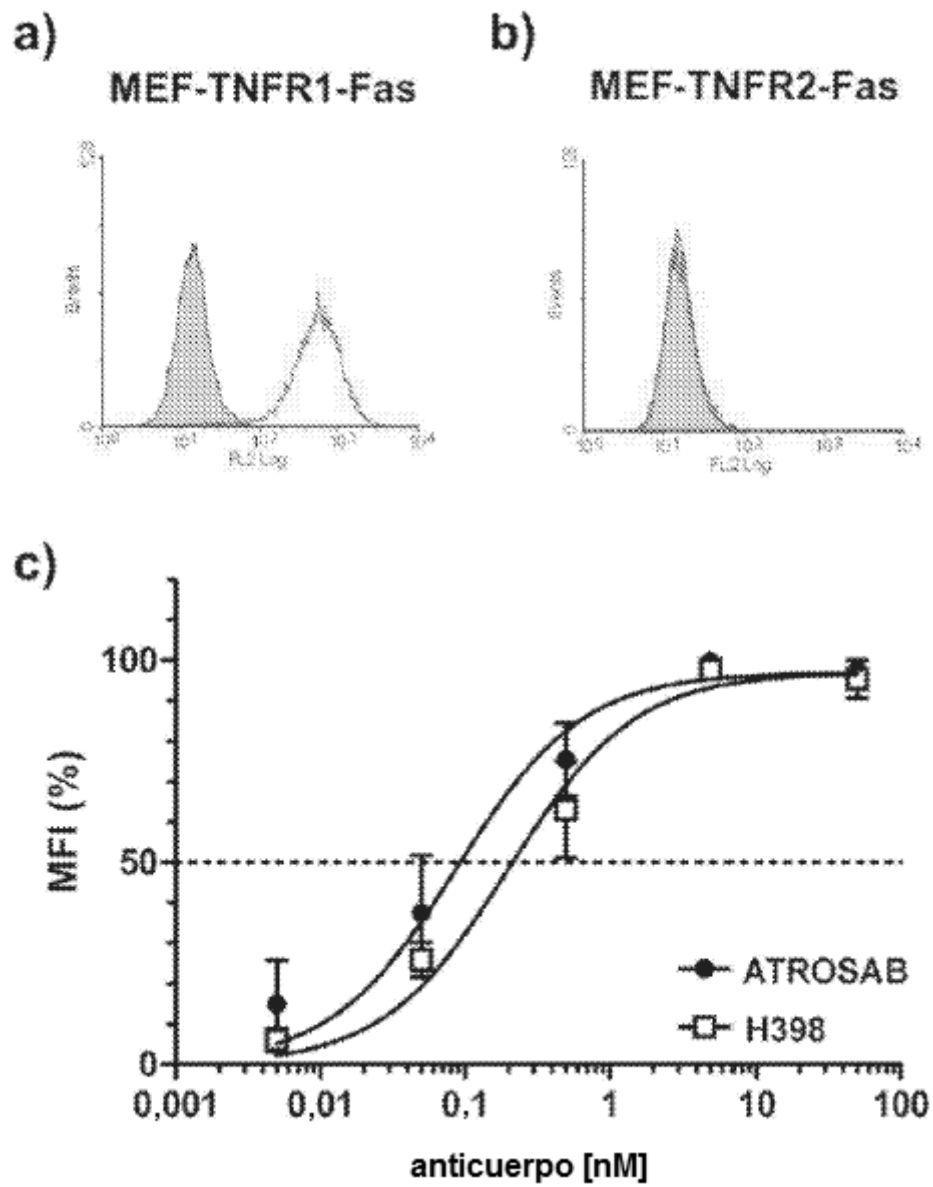


Fig. 3

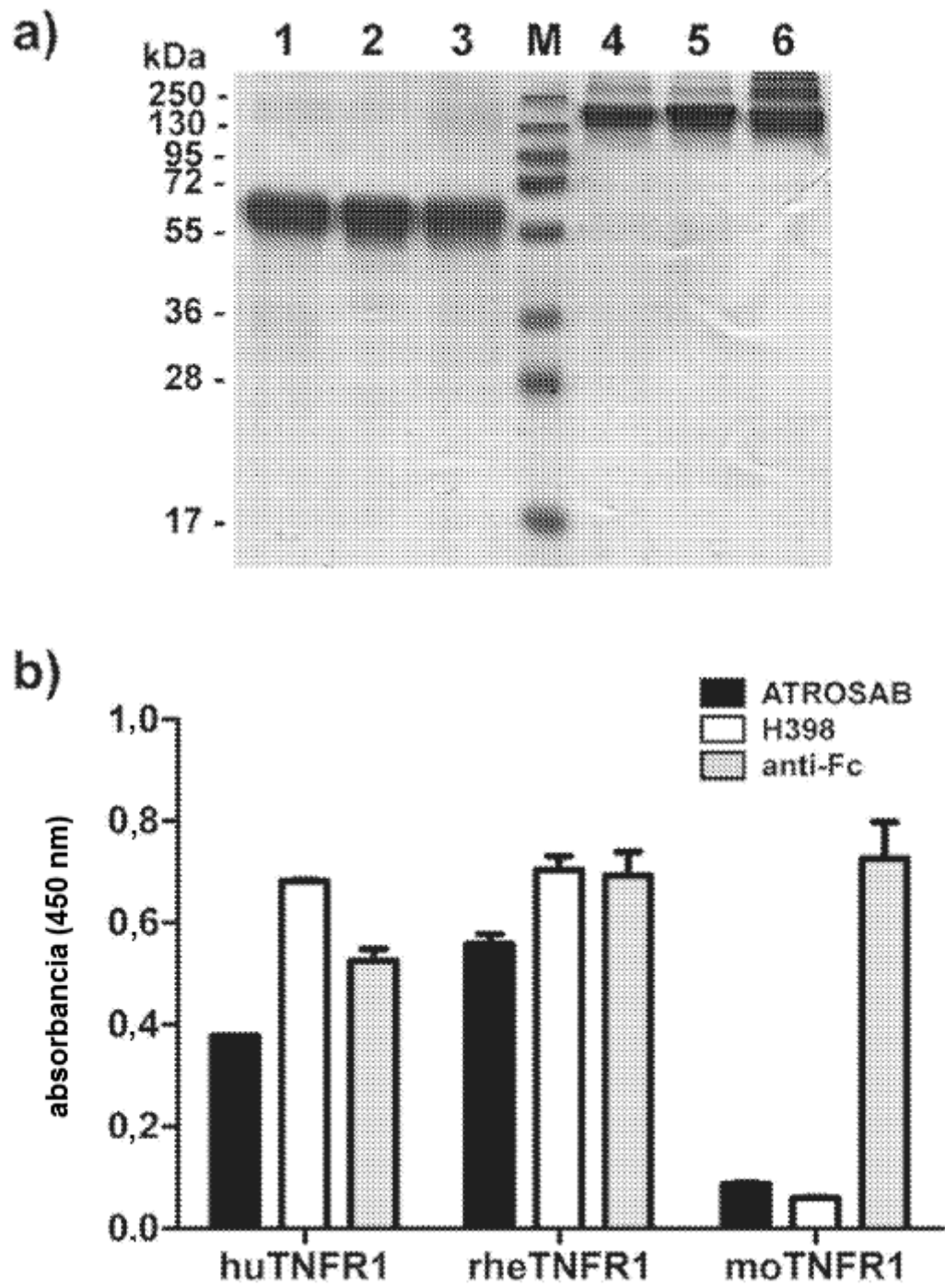




Fig. 4

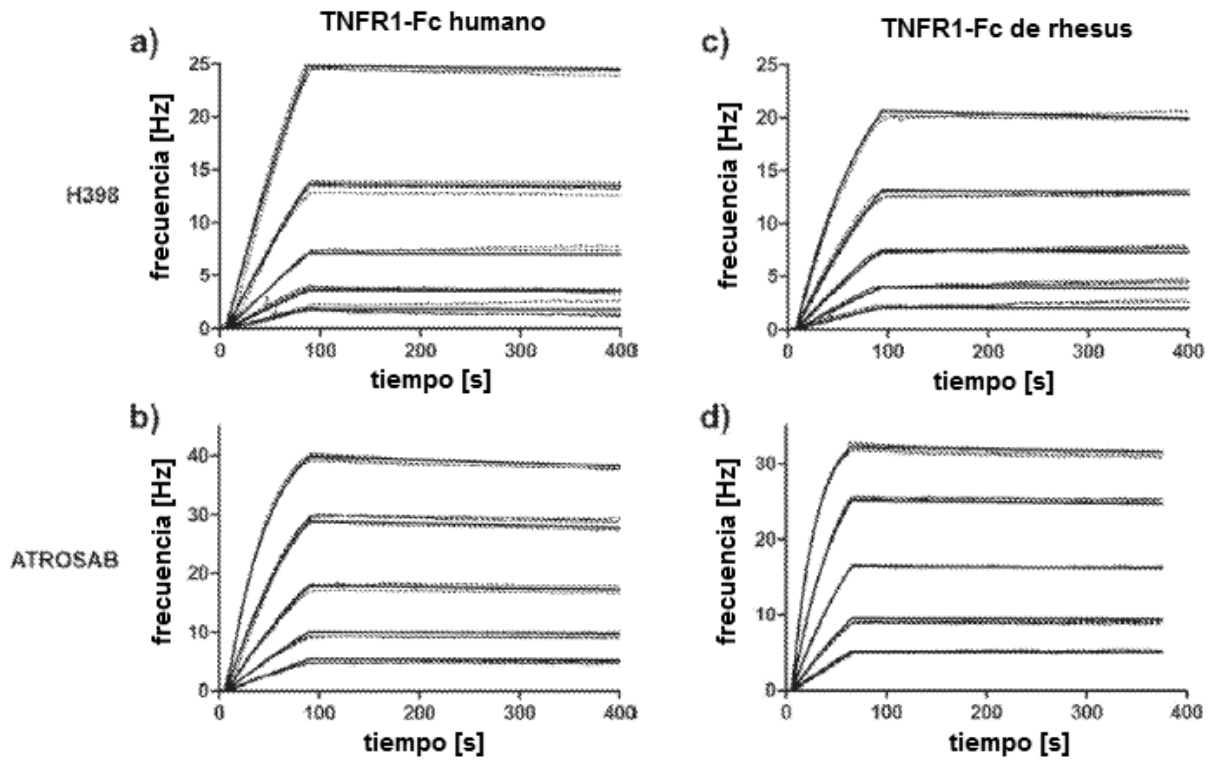


Fig. 5

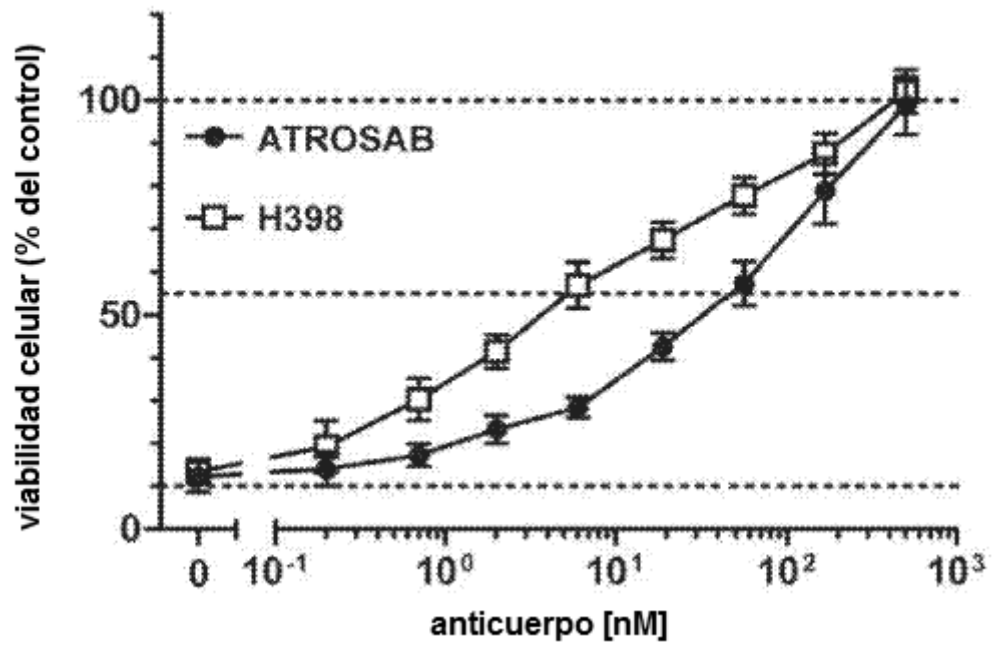


Fig. 6

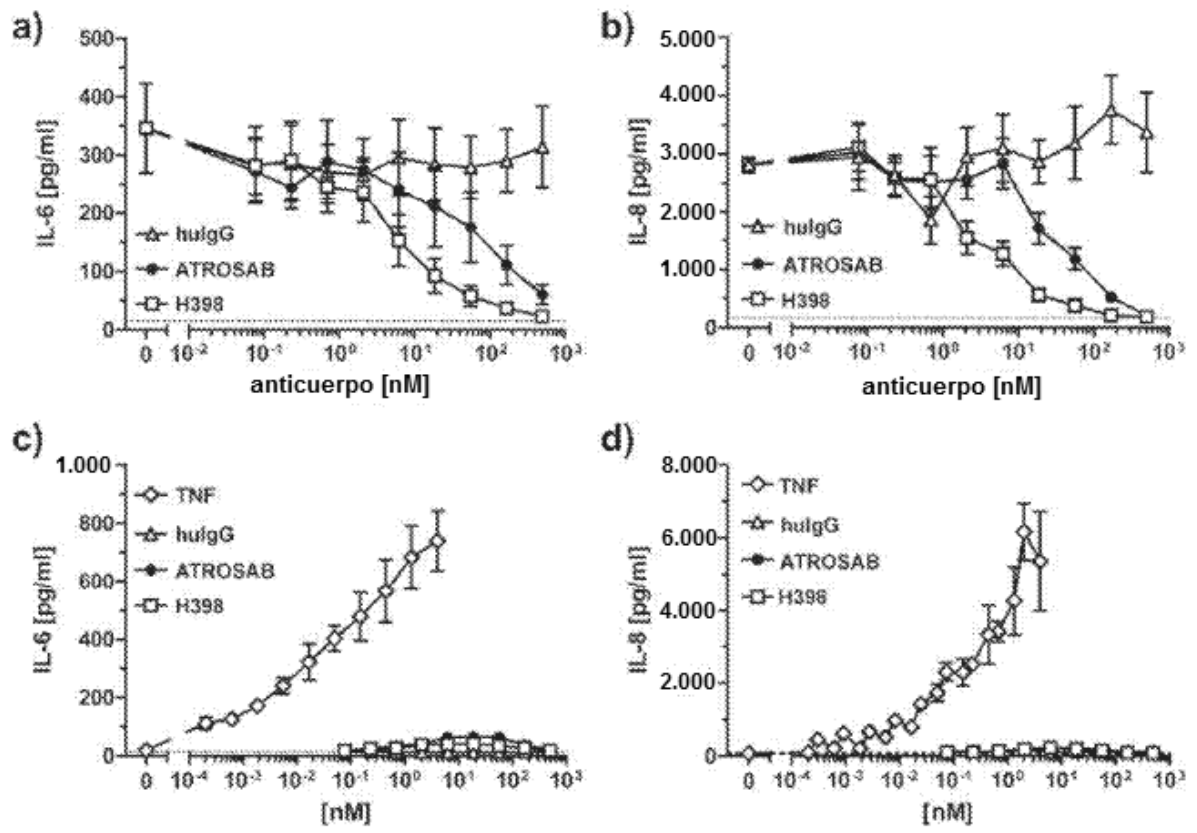


Fig. 7

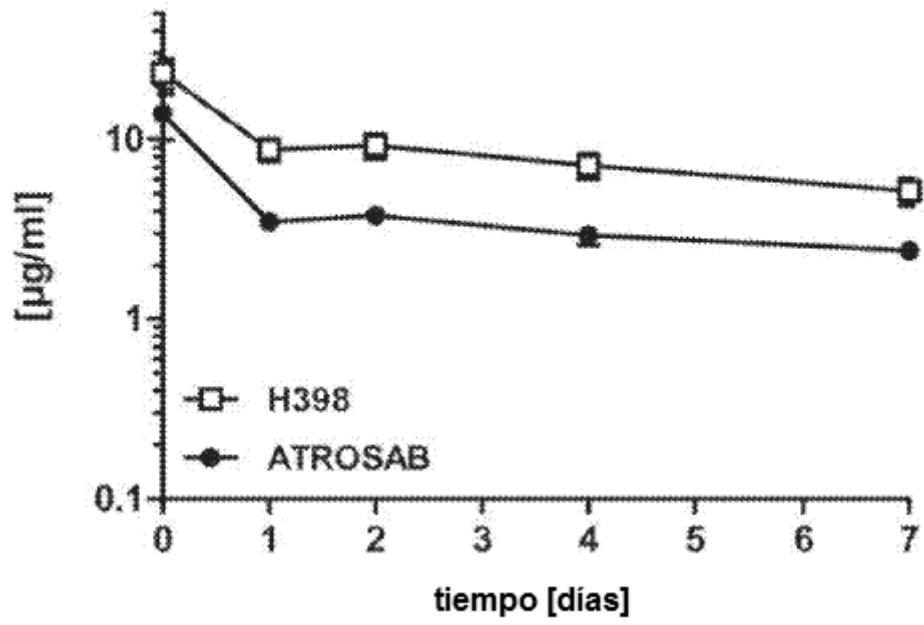


Fig. 8

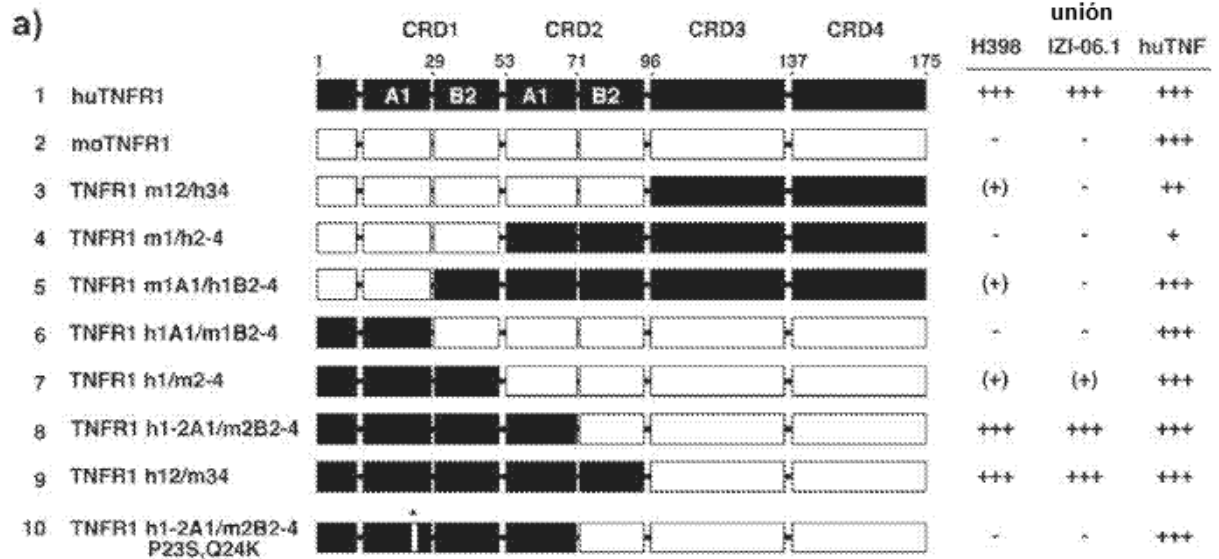


Fig 9

Fig. 9 a)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWWRQAPGQGLEWIGEIYPYSG  
HAYYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 9 b)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWWRQAPGQGLEWIGEIYPYSG  
HAYYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTV  
SS

Fig. 9 c)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Fig. 9 d)

DKTHTCPPCPAPPVAG

Fig. 9 e)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

Fig. 9 f)

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 9 g)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSN  
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 9 h)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSN  
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR

Fig 9 i)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 10:

SEQ ID NO.: 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Ile Asn

SEQ ID NO.: 2

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly His Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala

SEQ ID NO.: 3

Trp Asp Phe Leu Asp Tyr

SEQ ID NO.: 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr

SEQ ID NO.: 5

Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

SEQ ID NO.: 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

SEQ ID NO.: 7

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

SEQ ID NO.: 8

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



Fig. 11:

