

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 442**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2017 PCT/EP2017/057997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2017 E 17715705 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3440110**

54 Título: **Inhibidor monovalente de la interacción de huTNFR1**

30 Prioridad:

05.04.2016 EP 16163822

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

19.05.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT STUTTGART (50.0%)

Keplerstraße 7

70174 Stuttgart, DE y

BALIOPHARM AG (50.0%)

72 Inventor/es:

KONTERMANN, ROLAND;

PFIZENMAIER, KLAUS;

RICHTER, FABIAN;

ZETTLITZ, KIRSTIN;

SCHEURICH, PETER y

HERRMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 911 442 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

Inhibidor monovalente de la interacción de huTNFR1

La invención se refiere a un inhibidor de la interacción TNF - receptor huTNFR1 que reconoce monovalentemente huTNFR1 con una alta afinidad.

5 **Antecedentes**

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina pleiotrópica y un mediador central de la inflamación. Los niveles elevados de TNF están asociados con diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide, la psoriasis y la enfermedad de Crohn. Se han aprobado varios reactivos neutralizantes de TNF para el tratamiento de estas enfermedades, incluyendo los receptores de TNF solubles (etanercept), así como anticuerpos anti-TNF (infiximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab), y muchos más están en desarrollo. Con más de 1 millón de pacientes tratados con antagonistas del TNF, la eficacia terapéutica está bien documentada. Sin embargo, la inhibición global del TNF durante un período de tiempo prolongado aumenta el riesgo de reactivación de la tuberculosis, infecciones graves e incluso tumores malignos. En consecuencia, la información médica de todos los medicamentos anti-TNF aprobados incluye amplias advertencias y precauciones.

Dos receptores de TNF (CD120a, TNFR1 y CD120b, TNFR2) median la transducción de señales tras la unión de TNF (Locksley et al., 2001, Cell 104:487-501). Las respuestas proinflamatorias están mediadas principalmente por el TNFR1 expresado de forma ubicua. TNFR1 se activa tanto por la forma de TNF unida a la membrana (mTNF) como por el TNF soluble (sTNF), que se produce a partir de mTNF por escisión proteolítica. Por el contrario, TNFR2, expresado de una manera más restringida, p. ej., por células inmunes, células endoteliales y neuronas, solo puede ser activado por el mTNF. La activación de TNFR2 induce principalmente señales antiapoptóticas y puede conducir a la proliferación celular *in vitro*. Además, TNFR2 parece desempeñar un papel en la homeostasis y la regeneración de los tejidos.

La inhibición selectiva de la señalización de TNFR1 ha ganado cada vez más atención como alternativa a la neutralización global de TNF, que afecta a ambos receptores de TNF (Fischer et al. 2015, Antibodies 4:48-70). Recientemente, se ha descrito una muteína de TNF (R1antTNF) que neutraliza selectivamente la actividad de TNFR1 (Shibata et al. 2008, Cytokine 2:229-33). Esta muteína de TNF, administrada como proteína no modificada o PEGilada (PEG-R1antTNF), demostró eficacia terapéutica en modelos de hepatitis murina aguda y en un modelo de artritis inducida por colágeno murino. El efecto beneficioso de la inhibición selectiva de TNFR1 fue respaldado aún más por los resultados de una muteína de TNF negativa dominante (XPro1595), que es capaz de formar complejos inactivos con sTNF, lo que inhibe selectivamente la acción proinflamatoria mediada por TNFR1 mientras preserva la inmunidad innata frente a infecciones (Olleros et al. 2009, J. Infect. Dis. 199:1053-63).

La inhibición selectiva de TNFR1 también se puede lograr con anticuerpos específicos de TNFR1. Por ejemplo, un anticuerpo murino monoclonal, H398, y el anticuerpo descrito en US5736138, con selectividad para TNFR1 humano, mostró una potente inhibición de la transducción de señales mediada por TNF y la citotoxicidad (Moosmayer et al. 1995, Ther. Immunol. 2:31-40).

Una versión humanizada de H398 se describe en 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. Es importante destacar que 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 aumento dependiente de la dosis en la reticulación de TNFR1, lo que potencialmente forma complejos de señalización de TNFR1 funcionales e independientes del ligando.

Los intentos de maduración de la afinidad de IZI-06.1 dieron como resultado un mutante (scFvIG11) que mostró un aumento de dos veces en la afinidad de unión al antígeno que también se tradujo en una inhibición ligeramente mejorada de la citotoxicidad mediada por TNF *in vitro* (Zettlitz KA, Engineered antibodies for the therapy of cancer and inflammatory diseases " tesis 2012, Universität Stuttgart).

Kontermann et al. (Journal Of Immunotherapy 2008, 31(3):225-234) describen un fragmento de anticuerpo monovalente de IZI-06.1 como antagonista de TNF selectivo para TNFR1.

Se descubrió que los anticuerpos frente a TNFR1 tienen un potencial agonista al inducir una respuesta que imita al ligando. Esta respuesta sugiere que la transducción de señales se inicia mediante la agregación de receptores debido a la unión de los trímeros multivalentes de TNF. En particular, se sabía que los anticuerpos anti-TNFR1 divalentes conllevan el riesgo de activación de TNFR debido a la reticulación del receptor, lo que provoca reacciones proinflamatorias, incluida la citotoxicidad y la apoptosis, lo que sería contraproducente en el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF.

WO2012035141A1 describe un anticuerpo anti-huTNFR1 del tipo IgG1 llamado ATROSAB, que tiene una región Fc modificada deficiente en la mediación de la función efectora, lo que se encontró que limita el potencial agonista del anticuerpo.

Richter et al. (2013, PLoS One 8:e72156) describen la inhibición de TNFR1 para interaccionar con sus ligandos naturales TNF y linfotóxina alfa (LTα) por parte de ATROSAB, medida por la liberación de IL-6 e IL-8 de las células HeLa y HT1080, respectivamente, inducida por TNF o LTα.

Sumario de la invención

- 5 El objetivo fue proporcionar un agente anti-huTNFR1 mejorado con características inhibitoras de TNFR1 mejoradas mientras se evitaban los efectos secundarios causados por la actividad agonista mimética intrínseca del TNF.

El objeto se resuelve por el contenido según lo reivindicado.

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

- 10 De acuerdo con la invención, se proporciona un inhibidor de la interacción del TNF - receptor huTNFR1 que es una construcción de anticuerpo humanizado que reconoce monovalentemente huTNFR1 a través de un resto de unión a antígeno.

De acuerdo con la invención, el resto de unión a antígeno comprende

- un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y
- un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias CDR CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en el que

- 15 a) la secuencia de CDRH1 se identifica como SEQ ID 1;
- b) la secuencia de CDRH2 se identifica como SEQ ID 10, en la que X en la posición 5 es S;
- c) la secuencia CDRH3 se identifica como SEQ ID 3;
- d) la secuencia de CDRL1 se identifica como SEQ ID 4;
- e) la secuencia de CDRL2 se identifica como SEQ ID 5; y
- 20 f) la secuencia de CDRL3 se identifica como SEQ ID 11, en la que X en la posición 3 es S o G;
- y donde
- i) el VH comprende o consiste en la SEQ ID 13; y el VL comprende o consiste en la SEQ ID 19, o
- ii) el VH comprende o consiste en la SEQ ID 13; y el VL comprende o consiste en la SEQ ID 17.

- 25 Específicamente, el inhibidor descrito en la presente memoria presenta, sorprendentemente, propiedades de unión mejoradas en comparación con el scFvIG11 que se diseñó previamente por ingeniería como una versión mejorada de IZI-06.1.

- Específicamente, el resto de unión a antígeno se une a huTNFR1 con una K_D de menos de 5×10^{-9} M y una k_{disoc} de menos de 10^{-3} s⁻¹. La afinidad de la unión y las características de la unión (asociación y disociación) se determina específicamente en una prueba estándar para determinar la unión monovalente, excluyendo sustancialmente los efectos de avididad de la unión bivalente. Una prueba estándar se basa en la medición con microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) a temperatura fisiológica (aproximadamente 37 °C, o a 37 °C $\pm$ 1 °C). Tal medida de afinidad se realiza particularmente en un formato Fab. Por lo tanto, si la construcción del anticuerpo es distinta de una molécula Fab, el sitio de unión al antígeno se introduce particularmente en una molécula Fab respectiva para la medición de la afinidad mediante QCM a 37 °C. Esto asegura la comparabilidad de los resultados de la medición de la afinidad de los
- 30 aglutinantes monovalentes independientemente de los efectos de la avididad que podrían interferir con la medición de la afinidad. La QCM específicamente preferida se realiza a una densidad de receptor moderada. Específicamente, la afinidad de la construcción del anticuerpo que se une al huTNFR1 se determina para el formato Fab mediante QCM a 37 °C y una densidad de receptor moderada dentro del rango de 50-100 Hz, p. ej., a aproximadamente 50 Hz, o a 50 Hz $\pm$ 10 Hz, o a 50 Hz $\pm$ 5 Hz. Una prueba estándar para determinar la afinidad de unión por QCM se describe en la sección de ejemplos a continuación.
- 35
- 40

Específicamente, la K_D es inferior a 4×10^{-9} M, o inferior a 3×10^{-9} M, o inferior a 2×10^{-9} M, o inferior a 10^{-9} M, o incluso inferior a 10^{-10} M

Específicamente, la k_{disoc} es inferior a 10^{-3} , o inferior a 5×10^{-4} s⁻¹, o inferior a 10^{-4} s⁻¹, o inferior a 10^{-5} s⁻¹.

Específicamente, el resto de unión al antígeno reconoce el huTNFR1 con una k_{asoc} de al menos 10^5 M⁻¹ s⁻¹.

- 45 De acuerdo con un aspecto específico, el inhibidor inhibe directamente la interacción TNF - receptor huTNFR1 determinada en un ensayo basado en células, preferiblemente mediante un ensayo de inhibición de la muerte celular mediada por TNFR1 en células Kym-1, o mediante un ensayo de inhibición de la liberación de IL-6 o IL-8 de células

HeLa o células HT1080, respectivamente. Específicamente, en un ensayo de inhibición de la muerte celular mediada por TNFR1 en células Kym-1, el valor CI_{50} es inferior a $5,0 \times 10^{-9}$ M. Específicamente, en un ensayo de inhibición de la liberación de IL-6 de las células HeLa, el valor de CI_{50} es inferior a $4,0 \times 10^{-8}$ M, o en un ensayo de inhibición de la liberación de IL-8 de las células HT1080, el valor de CI_{50} es inferior a $2,0 \times 10^{-8}$ M.

- 5 Debido a la interacción monovalente, se eliminó específicamente un potencial agonista mimético de TNF de la construcción del anticuerpo, mientras que la mayor afinidad de unión a TNFR1, específicamente la baja tasa de disociación, proporciona una inhibición superior de las respuestas de TNF dependientes de TNFR1.

- 10 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el inhibidor inhibe directamente la interacción del receptor huTNFR1 con la linfotóxina alfa según se determina en un ensayo basado en células, preferiblemente mediante un ensayo de inhibición de la muerte celular mediada por TNFR1 en células Kym-1, o mediante un ensayo de inhibición de la liberación de IL-6 o IL-8 de células HeLa y/o células HT1080.

Específicamente, el resto de unión al antígeno comprende o consiste en uno o más dominios Fv que forman el sitio de unión monovalente. De acuerdo con un aspecto específico, los dominios Fv son un dominio VH y un dominio VL, ambos asociados entre sí a través de la interacción de la estructura de hoja beta de los dominios.

- 15 De acuerdo con un aspecto, el resto de unión al antígeno reconoce específicamente un epítipo que comprende el CRD1 distal a la membrana y el subdominio A1 de CRD2 de huTNFR1.

Un epítipo de unión específica está representado por el aminoácido 1 a 115 en la región N-terminal de huTNFR1.

- 20 De acuerdo con un aspecto específico, la construcción del anticuerpo se une específicamente a un epítipo que es el mismo epítipo o se solapa con el epítipo reconocido por el anticuerpo H398, como se describe más adelante en la presente memoria. Específicamente, la construcción del anticuerpo interfiere con la unión del anticuerpo H398 a su epítipo, de manera que se une competitivamente al huTNFR1.

- 25 Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende al menos el dominio VH como se reivindica, y opcionalmente los dominios Fv (como VH asociado o unido a VL) como se reivindica, que son de un anticuerpo H398 humanizado, madurado por afinidad. Específicamente, el anticuerpo H398 y el anticuerpo ATROSAB humanizado (como se describe más adelante en la presente memoria) se caracterizan por secuencias CDR que comprenden o consisten en lo siguiente:

SEQ ID 1: CDRH1 de H398

SEQ ID 2: CDRH2 de H398

SEQ ID 3: CDRH3 de H398

- 30 SEQ ID 4: CDRL1 de H398

SEQ ID 5: CDRL2 de H398

SEQ ID 6: CDRL3 de H398

- 35 Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende secuencias como se reivindica que son secuencias maduras por afinidad de un anticuerpo humanizado denominado ATROSAB, que comprende secuencias VH y VL con fines de maduración por afinidad. ATROSAB se caracteriza específicamente por las siguientes secuencias VH y VL:

SEQ ID 22: VH de ATROSAB

SEQ ID 23: VL de ATROSAB

Específicamente, el resto de unión al antígeno es

- 40 A

seleccionado del grupo que consiste en los miembros del grupo i) a ii), en el que

i)

es un resto de unión al antígeno que comprende

a) una secuencia de CDRH1 identificada por SEQ ID 1;

- 45 b) una secuencia de CDRH2 identificada por SEQ ID 10, en la que X en la posición 5 es S;

c) una secuencia de CDRH3 identificada por SEQ ID 3;

- d) una secuencia de CDRL1 identificada por SEQ ID 4;
 - e) una secuencia de CDRL2 identificada por SEQ ID 5; y
 - f) una secuencia de CDRL3 identificada por SEQ ID 11, en la que X en la posición 3 es G; y
- ii)

5 es un resto de unión al antígeno que comprende

- a) una secuencia de CDRH1 identificada por SEQ ID 1;
- b) una secuencia de CDRH2 identificada por SEQ ID 10, en la que X en la posición 5 es S;
- c) una secuencia de CDRH3 identificada por SEQ ID 3;
- d) una secuencia de CDRL1 identificada por SEQ ID 4;
- 10 e) una secuencia de CDRL2 identificada por SEQ ID 5; y
- f) una secuencia de CDRL3 identificada por SEQ ID 11, en la que X en la posición 3 es S.

De acuerdo con una realización específica, la construcción del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en moléculas Fab, moléculas scFv, Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), mitad de anticuerpos IgG1 y dominios Fv, o un derivado funcionalmente activo de cualquiera de los anteriores. preferiblemente en el que la construcción del anticuerpo se acopla a un polímero hidrófilo, tal como PEG, y/o se fusiona con un polipéptido, tal como albúmina sérica humana (o de ratón), transferrina, dominios o péptidos de unión a albúmina, dominios o péptidos de unión a Ig, extensiones de polipéptido mimético de PEG, un fragmento Fc de anticuerpo o un fragmento Fc de anticuerpo que lleva mutaciones para permitir la heterodimerización preferida (sobre la homodimerización).

Específicamente, la construcción del anticuerpo es cualquiera de un dominio Fab, scFv, dsFv o Fv, que se fusiona con un fragmento Fc del anticuerpo, donde el Fc consiste en un heterodímero de dominios CH2 y CH3, donde los dominios CH2 y/o CH3 llevan una o más mutaciones puntuales que permiten la heterodimerización preferencial sobre la homodimerización. Específicamente, uno o ambos dominios CH3 en el Fc se modifican para cambiar la estructura de aminoácidos, tal como para obtener un Fc que contiene el heterodímero de los dominios CH3/CH3.

Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende dominios Fv fusionados con una región o fragmento Fc de anticuerpo, con o sin dominios de anticuerpo adicionales, aun así, manteniendo la estructura de unión monovalente de la construcción del anticuerpo. Un ejemplo específico se refiere a un resto Fab o un resto Fv fusionado con Fc o Fc modificado.

Las construcciones específicas comprenden un Fc de IgG1 humana en la que los dominios CH2-CH3 forman un heterodímero a través de una o más mutaciones de "botones en ojales", p.ej.,

mutaciones de "botones" que modifican la superficie de las láminas beta de CH3, presentes en un monómero de dominio CH3, que es T366W; y

mutaciones de "ojales" que modifican la superficie de las láminas beta de CH3, presentes en el otro monómero del dominio CH3, que se seleccionan del grupo que consiste en T366S, L368A, Y407V.

Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende una región Fc que comprende una o más mutaciones para modular a la baja la función efectora. De acuerdo con un aspecto específico, la región Fc se modifica mediante glicoingeniería para modular a la baja la función efectora.

Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende una región Fc (IgG1 humana) que se caracteriza por dominios CH2 y CH3 silenciados por FcyR, p. ej., a través de una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S, S228P, L234A, L235A, H268Q, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A, V309L.

De acuerdo con un aspecto específico, la construcción del anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 que está mutada para modular a la baja la función efectora. 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 del índice Kabat EU). Preferiblemente, al menos dos de dichas mutaciones, más preferiblemente al menos tres, cuatro, cinco o la totalidad de las seis mutaciones se modifican por ingeniería a la secuencia Fc de IgG1 humana. La secuencia de Fc de IgG1 humana se incluye específicamente en la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID 24. La SEQ ID 24 identifica la secuencia de Fc de IgG1 humana y la región bisagra (región bisagra de IgG1 de tipo salvaje (SEQ ID 35), más los dominios CH2-CH3).

Específicamente, la construcción del anticuerpo comprende una región marco humanizada o humana.

Específicamente, la construcción del anticuerpo está PEGilada, HESilada o PSailada.

Específicamente, la construcción del anticuerpo se pega con un PEG de un peso molecular que oscila entre 5.000 y 150.000 g/mol. Los ejemplos de construcciones de anticuerpos, tales como Fab, se pegan con PEG 40.000.

5 Específicamente, la construcción del anticuerpo es un medio anticuerpo IgG1, caracterizado por solo una parte Fab, una región bisagra y una parte Fc, donde la región bisagra y/o la parte Fc (particularmente el Fc de IgG1 humana) comprende una o más mutaciones para evitar la dimerización de cadenas pesadas (Gu et al. (2015) PLoS One 10(1):e0116419), p. ej., seleccionadas del grupo que consiste en

- mutaciones en la región bisagra (SEQ ID 35): C226S, C229S (numeración EU), y

- mutaciones en la parte Fc: P395A, F405R, Y407R, K409D (numeración EU).

10 Específicamente, la construcción del anticuerpo es una proteína de fusión Fv-Fc, en la que la VH se fusiona con una primera cadena de dominio CH2-CH3 a través de una primera región bisagra, y la VL se fusiona con una segunda cadena de dominio CH2-CH3 a través de una segunda región bisagra. Preferiblemente, la primera y la segunda cadena de los dominios CH2-CH3 difieren entre sí en una o más mutaciones puntuales, para permitir la heterodimerización preferencial entre la primera y la segunda cadena de los dominios CH2-CH3, obteniendo así una preparación Fv-Fc
15 que se caracteriza por el heterodímero Fc, p. ej., a través de mutaciones de "botones en ojales" como se indicó anteriormente. Además, la primera y segunda región bisagra pueden modificarse como sigue: GTDKTHTSPPCAPPVAG (SEQ ID 42), GTDKTHTCPPSPAPPVAG (SEQ ID 43) o GTDKTHTSPPCAPPVAG (SEQ ID 44).

20 Específicamente, la construcción del anticuerpo es un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), que se caracteriza por uno o más enlaces disulfuro entre dominios (artificiales) adicionales. Dichos enlaces disulfuro se obtienen introduciendo uno o más residuos de cisteína adicionales en cualquiera de los dominios VH y VL en posiciones adecuadas que pueden usarse como pilar de puente de enlaces disulfuro que hacen de puente entre los dominios VH y VL, cuyos
25 enlaces disulfuro se obtienen al reducir las cisteínas. De acuerdo con ejemplos específicos, se puede introducir un enlace disulfuro en el Fv en cualquiera de las siguientes posiciones en VH y posiciones correspondientes en VL: 44C en VH y 100C en VL, 108C en VH y 55C en VL, 106C en VH y 56C en VL, o 101C en VH y 46C en VL.

De acuerdo con un aspecto específico, la construcción del anticuerpo comprende dominios Fv con mayor afinidad para unirse a huTNFR1 en comparación con los dominios Fv parentales, donde los dominios Fv parentales se caracterizan por un dominio VH parental identificado como SEQ ID 12 y un dominio VL parental identificado como SEQ ID 16.

30 Específicamente, el inhibidor según lo reivindicado comprende una combinación de dominio VH y VL, que se selecciona del grupo que consiste en los miembros del grupo i) a ii), en el que

i)

VH comprende o consiste en SEQ ID 13, y

VL comprende o consiste en SEQ ID 17;

y

35 ii)

VH comprende o consiste en SEQ ID 13, y

VL comprende o consiste en SEQ ID 19.

Específicamente, la termoestabilidad del inhibidor es de al menos 60 °C, o al menos 61 °C, o al menos 62 °C o al menos 63 °C, o al menos 64 °C, o al menos 65 °C, según se determina por dispersión dinámica de la luz.

40 La invención proporciona además una preparación farmacéutica que comprende el inhibidor descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Debido a las propiedades antagónicas del inhibidor y la construcción del anticuerpo, la preparación farmacéutica puede comprender altas concentraciones del inhibidor, evitando al mismo tiempo los efectos secundarios resultantes de la actividad agonista.

45 En ausencia de la estructura de inmunoglobulina de longitud completa, el inhibidor tiene específicamente una inmunogenicidad reducida y puede usarse repetidamente sin la formación de inhibidores, tales como anticuerpos antifármaco (ADA).

50 Sorprendentemente, se descubrió que el inhibidor se puede usar para tratar pacientes que desarrollan ADA, p. ej., que han desarrollado anticuerpos frente a inmunoterapéuticos de inmunoglobulina o de anticuerpos. En la técnica anterior, la presencia de dicho ADA excluiría particularmente inmunoterapias adicionales con anticuerpos dirigidos

frente a TNFR1, porque los ADA tienen el potencial de reticular los anticuerpos después de unirse al TNFR1 en la superficie celular, agonizando así la señalización de TNFR1. Sin embargo, el inhibidor descrito en la presente memoria sorprendentemente no agoniza la señalización de TNFR1 incluso en presencia de ADA.

5 Específicamente, la preparación farmacéutica se puede administrar a sujetos que han desarrollado ADA, p. ej., ADA frente a anticuerpos anti-huTNFR1 o cualquier estructura de IgG.

Específicamente, la preparación está formulada para uso parenteral, preferiblemente por administración intravenosa o subcutánea.

La invención proporciona además un método para producir el inhibidor de huTNFR1 descrito en la presente memoria empleando un sistema de expresión de mamífero recombinante para expresar la construcción del anticuerpo.

10 Específicamente, se utilizan líneas celulares de producción que son líneas celulares eucarióticas o de mamíferos, incluidas líneas celulares de diferente origen, p. ej., humano, tal como HEK o PER.C6; hámster, tal como CHO o BHK; mono, tal como COS-1 o COS-7; ratón, tal como C127, SP2/0 o NS0; o levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Específicamente, se emplea una línea celular de producción de CHO.

15 Las líneas celulares de producción procariotas alternativas incluyen, p.ej., *Escherichia coli*.

La invención proporciona además el inhibidor para su uso médico, específicamente, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que necesita una terapia anti-TNF.

Por tanto, en la presente memoria se describe un método para tratar a un sujeto humano que necesita una terapia anti-TNF, mediante la administración de una cantidad eficaz del inhibidor descrito en la presente memoria.

20 Específicamente, el inhibidor específico de TNFR1 se usa como un antagonista de TNF incapaz de reticular TNFR1, como una alternativa al tratamiento con un agente terapéutico anti-TNF. Dichos antagonistas de TNF, también considerados antagonistas biológicos de TNF, se proporcionan típicamente para su uso terapéutico cuando se ha demostrado la relevancia biológica de la función de TNF mediada por TNFR1 en la patogénesis de la inflamación crónica no infecciosa de las articulaciones, la piel y el intestino.

25 Los anticuerpos específicos de fármacos (ADA) inducidos por anticuerpos terapéuticos o anticuerpos naturales también pueden provocar una actividad agonista no deseada, debido al potencial de reticular el TNFR1 unido al fármaco y activar la señalización de TNFR1. Por lo tanto, la construcción del anticuerpo preferida está desprovista de una región Fc homodimerizante o desprovista de una región Fc, tal como un formato Fab o scFv, y es menos probable que la composición farmacéutica respectiva dé como resultado una reticulación y una mayor actividad estimuladora
30 frente a los procesos inflamatorios.

De acuerdo con un aspecto específico, el inhibidor se administra repetidamente al sujeto.

Se prefiere que el inhibidor o el anticuerpo descrito en la presente memoria tenga un potencial inmunogénico bajo y pueda usarse para tratar a un sujeto sin inducir una respuesta inmune no deseada frente al anticuerpo.

35 Con este fin, la construcción del anticuerpo preferida consiste en secuencias de anticuerpos humanizados y está desprovista, p. ej., de una región Fc homodimerizante o desprovista de una región Fc, tal como un formato Fab o scFv. Es menos probable que la composición farmacéutica respectiva dé como resultado una pérdida de tolerancia (p. ej., tras la administración repetida), mejorando así tanto el perfil de seguridad como el de eficacia del agente terapéutico.

40 Un aspecto específico se refiere al tratamiento de sujetos que padecen una respuesta inmune o un alto nivel de anticuerpos frente a anticuerpos terapéuticos, en particular anticuerpos que comprenden una región Fc que han sido utilizados para terapias anteriores. Dichos pacientes se tratan preferiblemente con una construcción del anticuerpo descrita en la presente memoria desprovista de la región Fc homodimerizante o desprovista de la región Fc.

45 Específicamente, el inhibidor descrito en la presente memoria se proporciona para su uso médico en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad en la que están indicadas terapias anti-TNF o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) no biológicos. Específicamente, el uso médico abarca un tratamiento de primera línea con una cantidad efectiva del inhibidor, donde están indicadas terapias anti-TNF o DMARD no biológicos, o como tratamiento de segunda línea donde han fracasado los agentes terapéuticos anti-TNF o DMARD no biológicos.

Específicamente, como se establece en las reivindicaciones, el sujeto padece de

a) inflamación aguda o crónica de las articulaciones, la piel y el intestino (infecciosa o no infecciosa); y/o

50 b) enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn (Morbus Crohn), esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, shock séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda

y crónica, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, colitis ulcerosa, pancreatitis, EPOC, infecciones virales o bacterianas fulminantes agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, síndrome de fiebre periódica, querubismo y cáncer.

- 5 En particular, se tratan afecciones de enfermedades inflamatorias que están asociadas con cualquiera de las enfermedades enumeradas anteriormente. Específicamente, se trata el sujeto que padece de cualquiera de las enfermedades de a) y cualquiera de las enfermedades de b) anteriores.

10 De acuerdo con un aspecto específico, la invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica el inhibidor descrito en la presente memoria. Específicamente, el ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico no codificante o codificante que no se presenta de forma natural con el ácido nucleico, tal como la inclusión de secuencias reguladoras o promotoras heterólogas. Específicamente, el ácido nucleico es un ácido nucleico artificial.

La invención proporciona además un vector de expresión que comprende el ácido nucleico descrito en la presente memoria.

15 Específicamente, en la presente memoria se describe un vector que comprende un casete de expresión o un plásmido, cada uno de los cuales comprende una secuencia codificante para expresar una construcción proteica que comprende o consiste en un polipéptido o proteína, o un derivado de proteína, que comprende el sitio de unión al antígeno o el VH. y/o VL del anticuerpo inhibidor como se describe en la presente memoria.

La invención proporciona además una célula huésped que comprende el casete de expresión, el vector de expresión o el plásmido como se describe en la presente memoria.

20 La invención proporciona además un método para producir el inhibidor como se describe en la presente memoria, en el que la célula huésped se cultiva o mantiene en condiciones para producir dicho anticuerpo.

Se prefiere específicamente una célula huésped y un método de producción que emplea dicha célula huésped, célula huésped que comprende

- un vector de expresión, que incorpora una secuencia codificante para expresar la cadena ligera del anticuerpo; y
- 25 - un vector de expresión, que incorpora una secuencia codificante para expresar la cadena pesada del anticuerpo.

De acuerdo con un aspecto específico, la invención proporciona además una célula huésped recombinante que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión descrito en la presente memoria.

Figuras

30 **Figura 1. Unión de H398 y ATROSAB a TNFR1-Fc humano.** a) La unión en equilibrio de ATROSAB y H398 se analizó mediante ELISA estándar (n=3, media + SD). Cinética de unión por QCM de ATROSAB (b) y H398 (c) probada en condiciones de alta densidad de receptores (195 Hz). Se aplicaron triplicados de cinco concentraciones entre 3,9 nM y 62,5 nM.

35 **Figura 2. Inhibición de la acción del TNF por ATROSAB y H398.** Inhibición de la secreción de IL-8 de las células HT1080 con concentraciones crecientes de ATROSAB y H398 inducidas por TNF 0,1 nM (a) y LT α (b). Los datos de n = 3 experimentos se muestran como porcentaje de la liberación máxima de IL, desencadenada por TNF o LT α solos.

Figura 3. Cinética de unión a baja densidad de receptores. Determinación de la afinidad de Atrosab (a) y H398 (b) por TNFR1-Fc humano por QCM a una densidad de receptor de 48 Hz.

40 **Figura 4. Alineación de secuencias de scFvZI06.1 (VH: SEQ ID 20, VL: SEQ ID 21) con secuencias VH y VL parentales y variantes maduras por afinidad.** a) secuencias VH alineadas de ATROSAB (scFvZI06.1), scFvIG11, scFvT12B y scFvFRK13.7. b) Alineación de secuencias VL. Los residuos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat y los puntos representan aminoácidos idénticos en comparación con scFvZI06.1. Las secuencias de 4 aminoácidos o más se indican como sigue. Secuencias en FR1 de scFvFRK13.7: SASV (SEQ ID 36); DRVY (SEQ ID 37). Secuencia en FR3 de scFvFRK13.7: SLQP (SEQ ID 38).

45 **Figura 5. Selección de Biblioteca EP03.** Se analizó la unión total del conjunto de fagos amplificados a TNFR1-Fc humano en ELISA después de cada ronda de selección (a). Los candidatos seleccionados se expresaron como formatos de scFv solubles y se probaron para determinar su unión a TNFR1-Fc humano en mediciones de QCM (b). Se muestran la media y la SD de un solo experimento con duplicados, scFvZI06.1 y scFvIG11 sirvieron como controles en b.

50 **Figura 6. Expresión y caracterización de scFvT12B.** A) SDS-PAGE teñida con Coomassie (12 %) de scFvT12B y los anticuerpos de control scFvZI06.1 y scFvIG11. La unión a TNFR1-Fc humano se probó en análisis ELISA (b) y QCM (c), donde se muestran la medición (línea discontinua) y el ajuste (línea continua). La inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF (0,1 nM) se demostró en d). B) y d) muestran la media y la SD de dos (d) o tres (b)

experimentos individuales realizados por duplicado.

Figura 7. Alineación de scFvZI06.1 (VH: SEQ ID 20, VL: SEQ ID 21) con las secuencias humanizadas. Las secuencias humanizadas de VH (a) y VL (b) se alinearon con la secuencia del fragmento variable monocatenario de ATROSAB. Los residuos idénticos están representados por puntos. Las secuencias de 4 aminoácidos o más se indican como sigue. Secuencia en VH (a) FR1 de FRK13.1 y FRK13.2: GGLV (SEQ ID 39). Secuencias en VH (a) FR3 de FRK13.1 y FRK13.2: NAKNSL (SEQ ID 40), LQMN (SEQ ID 41). Secuencias en VL (b) FR1 de FRK13.1 y FRK13.2: SASV (SEQ ID 36); DRV T (SEQ ID 37). Secuencia en VL (b) FR3 de FRK13.1 y FRK13.2: SLQP (SEQ ID 38).

Figura 8. Producción de anticuerpos scFv humanizados. A) genotipo de variantes de scFv humanizadas combinado con scFvT12B. Los fragmentos de scFv purificados se analizaron por SDS-PAGE (b, 12 %, teñido con Coomassie) y posteriormente por SEC (c, columna Yarra SEC-2000, caudal 0,5 ml/min) en el caso de expresión adecuada.

Figura 9. Unión a y bloqueo de TNFR1 humano. Los anticuerpos scFv humanizados se analizaron mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (a) y la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF (0,1 nM) de las células HT1080 (b, realizado solo para scFv de unión fuerte). scFvZI06.1 y scFvT12B sirvieron como controles (se muestran la media y la SD, n=3).

Figura 10. Estabilidad térmica de fragmentos scFv humanizados. La estabilidad molecular de los anticuerpos scFv se analizó mediante dispersión dinámica de la luz. T_m se determinó mediante la interpretación visual de los puntos de datos mostrados.

Figura 11. Expresión y Purificación de IgG13.7 y Fab13.7. La expresión y la purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE (a, gel de separación al 12 %, condiciones reductoras; b, gel de separación al 8 %, condiciones reductoras) y cromatografía de exclusión por tamaño (c, columna Yarra SEC-2000, caudal 0,5 ml/min). El peso molecular indicado se interpoló de acuerdo con proteínas estándar de masa y tiempo de retención conocidos.

Figura 12. Selectividad de especie de los derivados scFv13.7. La unión de IgG13.7 y Fab13.7 a TNFR1 y 2 de origen humano y de ratón se probó en ELISA estándar. Se presentan la media y la SD de dos experimentos individuales.

Figura 13. Unión en equilibrio de anticuerpos FRK13.7 a TNFR1-Fc humano. Se probaron concentraciones crecientes para determinar su unión a huTNFR1-Fc en ELISA (n=3, media $\pm$ SD).

Figura 14. Análisis por QCM de IgG y Fab derivados de scFvFRK13.7. Los datos cinéticos en tiempo real de la interacción de ATROSAB (a), FabATR (b), IgG13.7 (c) y Fab13.7 (d) con TNFR1-Fc humano se recogieron utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo. Se analizaron triplicados de concentración entre 64 nM y 4 nM (ATROSAB e IgG13.7) o 128 nM a 8 nM (FabATR y Fab13.7).

Figura 15. Bioactividad de los anticuerpos FRK13.7. La liberación de IL-8 de las células HT1080 desencadenada por los formatos de anticuerpos FRK13.7 se muestra en a y b (aumentado de tamaño para mostrar construcciones con agonismo bajo y ausente) junto con la liberación de IL-6 de las células HeLa (c). TNF, ATROSAB y FabATROSAB (FabATR) sirvieron como controles. Se presentan la media y la SD de dos experimentos individuales.

Figura 16. Inhibición de la liberación de interleuquinas inducida por TNF por Fab13.7. Se presenta la inhibición de la liberación de IL-8 (a) e IL-6 (b), inducida por TNF 0,1 nM. ATROSAB y FabATROSAB (FabATR) sirvieron como controles. Se presentan la media y la SD de tres experimentos individuales.

Figura 17. Inducción e inhibición de la citotoxicidad de Kym-1. El potencial de IgG13.7 y Fab13.7 para desencadenar la muerte celular en células Kym-1 se analizó mediante tinción con KV de las células adherentes restantes (a). En el mismo ensayo se analizó el potencial inhibidor de Fab13.7 para inhibir la citotoxicidad inducida por TNF 0,01 nM (b). ATROSAB y FabATR sirvieron como controles. Se presentan la media y la SD de dos a tres experimentos individuales (estimulación de la citotoxicidad [a] n=2, inhibición [b] n=3).

Figura 18. Reticulación de ATROSAB y Fab13.7. La unión dependiente de la concentración de un suero de cabra policlonal específico de Fab a Fab3.7 se demostró mediante ELISA (a). En un ensayo de liberación de IL-8, se analizó el efecto de Fab13.7 reticulado en HT1080, en comparación con ATROSAB (n=2, media $\pm$ SD), usando 64 μ g/ml de suero de cabra específico de Fab.

Figura 19. Estudio farmacocinético de Fab13.7 y FabATR. La semivida inicial y terminal en plasma después de la inyección de una dosis única (25 μ g), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de ATROSAB se determinaron utilizando ratones C57BL/6J (n=3) que portan de forma homocigota el dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen del ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 20. Producción y bioactividad de Fab13.7PEG. a) genotipo de Fab13.7PEG. b) La modificación con polietilenglicol (PEG) de la proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE (12 %, teñido con Coomassie). Se utilizaron concentraciones variables de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y cadenas de PEG de diferentes longitudes

(5 kDa, 20 kDa, 40 kDa). c) Fab13.7_{PEG} se probó mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (n = 3, Media ± SD). d) Se analizó liberación de IL-6 de células HeLa desencadenada por Fab13.7_{PEG} así como la inhibición de la liberación de IL-6 inducida por TNF, utilizando TNF humano recombinante 0,1 nM (e, n = 3, Media ± SD). f) Se determinaron la semivida en plasma inicial y terminal después de la inyección de una dosis única (25 µg), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de Fab13.7_{PEG} y las proteínas de referencia Fab13.7 y ATROSAB usando ratones C57BL/6J (n = 3) portadores homocigotos del dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen de ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 21. Producción y bioactividad de Fab13.7-MSA. a) genotipo de Fab13.7-MSA. b) La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE (12 %, teñida con Coomassie) y posteriormente mediante SEC (c, columna Yarra SEC-2000, caudal 0,5 ml/min). d) Se probó Fab13.7-MSA mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (n = 2, Media ± SD). e) Se analizó la liberación de IL-8 de células HT1080 desencadenada por Fab13.7-MSA (n = 1, Media ± SD de duplicados), así como la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF, utilizando TNF humano recombinante 0,1 nM (f, n = 2, Media ± SD). g). Se determinaron la semivida en plasma inicial y terminal después de la inyección de una dosis única (25 µg), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de Fab13.7-MSA y las proteínas de referencia Fab13.7 y ATROSAB utilizando ratones C57BL/6J (n=3) portadores homocigotos del dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen de ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 22. Producción y bioactividad de IgG13.7_{mitad}. a) genotipo de IgG13.7_{mitad}. b) La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE (12 %, teñida con Coomassie) y posteriormente mediante SEC (c, columna Yarra SEC-2000, caudal 0,5 ml/min). d) Se probó IgG13.7_{mitad} mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (n = 2, Media ± SD). e) Se analizó la liberación de IL-8 de células HT1080 desencadenada por IgG13.7_{mitad} (n = 1, Media ± SD de duplicados) así como la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF, utilizando TNF humano recombinante 0,1 nM (f, n = 2, Media ± SD). g) Se determinaron la semivida en plasma inicial y terminal después de la inyección de una dosis única (25 µg), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de IgG13.7_{mitad} y las proteínas de referencia Fab13.7 y ATROSAB usando ratones C57BL/6J (n = 3) portadores homocigotos del dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen de ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 23. Producción y bioactividad de Fab13.7-Fc_{kih}0DS. a) genotipo de Fab13.7-Fc_{kih}0DS. b) La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE (12 %, teñida con Coomassie) y posteriormente mediante SEC (c, columna Yarra SEC-3000, caudal 0,5 ml/min). d) Se probó Fab13.7-Fc_{kih}0DS mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (n = 2, Media ± SD). e) Se analizó la liberación de IL-8 de células HT1080 desencadenada por Fab13.7-Fc_{kih}0DS (n = 2, Media ± SD) así como la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF, utilizando TNF humano recombinante 0,1 nM (f, n = 2, Media ± SD). g) Se determinaron la semivida en plasma inicial y terminal después de la inyección de una dosis única (25 µg), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de Fab13.7-Fc_{kih}0DS y las proteínas de referencia Fab13.7 y ATROSAB usando ratones C57BL/6J (n=3) portadores homocigotos del dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen de ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 24. Producción y bioactividad de Fv13.7-Fc_{kih}0DS. a) genotipo de Fv13.7-Fc_{kih}0DS. b) La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE (12 %, teñida con Coomassie) y posteriormente mediante SEC (c, columna Yarra SEC-3000, caudal 0,5 ml/min). d) Se probó Fv13.7-Fc_{kih}0DS mediante ELISA para determinar la unión a TNFR1-Fc humano (n = 1, Media ± SD de duplicados). e) Se analizó la liberación de IL-8 de células HT1080 desencadenada por Fv13.7-Fc_{kih}0DS (n = 2, Media ± SD) así como la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por TNF, utilizando TNF humano recombinante 0,1 nM (f, n = 2, Media ± SD). g) Se determinaron la semivida en plasma inicial y terminal después de la inyección de una dosis única (25 µg), así como la biodisponibilidad (área bajo la curva) de Fv13.7-Fc_{kih}0DS y las proteínas de referencia Fab13.7 y ATROSAB usando ratones C57BL/6J (n=3) portadores homocigotos del dominio extracelular de TNFR1 humano en el locus del gen de ratón. El anticuerpo activo remanente en las muestras de suero fue detectado por ELISA.

Figura 25. Secuencias de anticuerpos (SEQ ID 1-33)

La invención, tal como se reivindica, se refiere a secuencias de construcciones de anticuerpos que incluyen la designación T12B, o 13.7 en sus nombres, tal como se hace referencia en la Figura 25 y como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Las reivindicaciones no abarcan otras secuencias expuestas en la Figura 25.

SEQ ID 1: CDRH1 de H398 o ATROSAB

SEQ ID 2: CDRH2 de H398 o ATROSAB

SEQ ID 3: CDRH3 de H398 o ATROSAB

SEQ ID 4: CDRL1 de H398 o ATROSAB

- SEQ ID 5: CDRL2 de H398 o ATROSAB
- SEQ ID 6: CDRL3 de H398 o ATROSAB
- SEQ ID 7: variantes de CDRH2 de SEQ ID 2
- SEQ ID 8: variantes de CDRL3 de SEQ ID 6
- 5 SEQ ID 9: variante de CDRH2 IG11
- SEQ ID 10: variantes de CDRH2 T12B o Fab13.7
- SEQ ID 11: variante de CDRL3 T12B
- SEQ ID 12: secuencia VH de IG11
- SEQ ID 13: secuencia VH de T12B o 13.5 o 13.7
- 10 SEQ ID 14: secuencia VH de 13.1 o 13.3 o 13.6
- SEQ ID 15: secuencia VH de 13.2 o 13.4 o 13.8
- SEQ ID 16: secuencia VL de IG11
- SEQ ID 17: secuencia VL de T12B o 13.6 o 13.8
- SEQ ID 18: secuencia VL de 13.1 o 13.4 o 13.5
- 15 SEQ ID 19: secuencia VL de 13.2 o 13.3 o 13.7
- SEQ ID 20: secuencia VH de scFvIZI06.1
- SEQ ID 21: secuencia VL de scFvIZI06.1
- SEQ ID 22: VH de ATROSAB
- SEQ ID 23: VL de ATROSAB
- 20 SEQ ID 24: Fc de IgG humana
- SEQ ID 25: Cadena pesada de Fab13.7
- SEQ ID 26: Cadena ligera de Fab13.7
- SEQ ID 27: Cadena pesada de Fab13.7_{PEG}
- SEQ ID 28: Cadena pesada de Fab13.7-MSA
- 25 SEQ ID 29: Cadena pesada de IgG13.7_{mitad}
- SEQ ID 30: Fd13.7-Fc0DS
- SEQ ID 31: LC13.7-Fc0DS
- SEQ ID 32: VH13.7-Fc0DS
- SEQ ID 33: VL13.7-Fc0DS
- 30 SEQ ID 34: MODIFICACIÓN EN Fab13.7 PARA INSERTAR PEG
- SEQ ID 35: Bisagra_{0DS}
- SEQ ID 36: Secuencia introducida en FR1 de scFvFRK13.7
- SEQ ID 37: Secuencia introducida en FR1 de scFvFRK13.7
- SEQ ID 38: Secuencia introducida en FR3 de scFvFRK13.7
- 35 SEQ ID 39: Secuencia introducida en FR1 de FRK13.1 y FRK13.2
- SEQ ID 40: Secuencia introducida en FR3 de FRK13.1 y FRK13.2
- SEQ ID 41: Secuencia introducida en FR3 de FRK13.1 y FRK13.2

SEQ ID 42-44: regiones bisagra modificadas

La nomenclatura tal y como se usa en la presente memoria tendrá el siguiente significado:

VH CDR1 = CDRH1

VH CDR2 = CDRH2

5 VH CDR3 = CDRH3

VL CDR1 = CDRL1

VL CDR2 = CDRL2

VL CDR3 = CDRL3

10 A menos que se indique lo contrario, en la presente memoria se hace referencia a las secuencias de CDR numeradas de acuerdo con Kabat, es decir, determinadas de acuerdo con la nomenclatura de Kabat (véase, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª d. Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (1991)), y en particular aquellas secuencias de CDR que se enumeran en las Figuras. Se entiende bien que la invención y el alcance de las reivindicaciones también abarcarán los mismos anticuerpos y CDR, pero con una numeración diferente y una región CDR designada, donde las regiones CDR se definen de acuerdo con el sistema IMGT (The international ImMunoGeneTics, Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212).

Descripción detallada de la invención

El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto.

20 Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. A los efectos de la presente invención, el término "que consiste en" se considera un aspecto preferido del término "que comprende". Si en lo sucesivo se define un grupo que comprende al menos un cierto número de especies, esto significa que también abarca un grupo que preferiblemente consiste solo en estas especies.

25 En la presente memoria, el "inhibidor" se describe como una "construcción de anticuerpo" o un "anticuerpo". El término "construcción de anticuerpo", tal y como se usa en la presente memoria, también denominado simplemente "anticuerpo" o "anticuerpo de la invención", se referirá a anticuerpos no naturales que son construcciones artificiales diseñadas por ingeniería para unirse monovalentemente a la diana huTNFR1, u obtenidos por escisión de un anticuerpo natural en fragmentos. A tal fin, se entiende que el término "anticuerpo" engloba polipéptidos o proteínas que consisten en o comprenden dominios de anticuerpo, entendiendo por estos dominios constantes y/o variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de las inmunoglobulinas, con o sin secuencia conectora. Los polipéptidos se entienden como dominios de anticuerpos, si comprenden una estructura de barril beta que consiste en al menos dos cadenas beta de una estructura de dominio de anticuerpo conectadas por una secuencia de bucle. Los dominios de anticuerpos pueden tener una estructura nativa o modificarse mediante mutagénesis o derivatización, p. ej., para modificar las propiedades de unión al antígeno o cualquier otra propiedad, tal como la estabilidad o propiedades funcionales, tales como la unión a los receptores Fc FcRn y/o al receptor Fcγ. 35

La construcción de anticuerpo tal y como se usa en la presente memoria comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que solo un resto de unión a antígeno del anticuerpo reconoce la diana huTNFR1. Por lo tanto, la unión de la construcción de anticuerpo al receptor huTNFR1 es solo monovalente. En particular, el resto de unión a antígeno comprende un sitio de unión a antígeno o un dominio de anticuerpo que porta un sitio de unión a antígeno. Cualquiera de los dominios de anticuerpos variables solos o en combinación puede emplearse para construir el sitio de unión al antígeno. Específicamente, un sitio de unión a antígeno está formado por una combinación de secuencias de CDR. Tal combinación de secuencias de CDR también se entiende como un sitio de unión de CDR, p. ej., el bolsillo de unión a antígeno formado por tres secuencias CDR de un dominio variable, tal como la combinación de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, o la combinación de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, o bien seis secuencias CDR de dos dominios variables, tal como la combinación de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Alternativamente, se puede emplear un sitio de unión a antígeno que se deriva de un ligando natural del receptor, o una construcción artificial. 40 45

Específicamente, un sitio de unión de CDR de un solo dominio de anticuerpo variable puede usarse como sitio de unión a antígeno, tal como un sitio de unión de dominios de las cadenas pesada y ligera de la región variable (tales como dAb, Fd, VL, Vkappa, Vlambd, VH, VHH), o un sitio de unión de pares de dominios de anticuerpos variables, tal como un par VH/VL. 50

Por lo tanto, la construcción de anticuerpo que comprende un sitio de unión de CDR puede comprender un único dominio de anticuerpo variable o un par de dominios de unión variables y, opcionalmente, comprender además otros dominios variables, pero con una especificidad de unión a antígeno diferente, es decir, una construcción de anticuerpo

biespecífica o poliespecífica, en la que solo un sitio de unión a antígeno se dirige a huTNFR1, y al menos otro sitio de unión a antígeno se dirige a una diana diferente de huTNFR1, porque la construcción de anticuerpo, como se describe más adelante en la presente memoria, solo se une monovalentemente a la diana huTNFR1. Opcionalmente, la construcción de anticuerpo comprende además dominios de anticuerpos constantes, o combinaciones de dominios de anticuerpos variables y/o constantes con o sin una secuencia conectora o una región bisagra. Las construcciones de anticuerpo ejemplares son Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv, Fv o un anticuerpo de longitud completa.

Los aglutinantes monoespecíficos monovalentes ejemplares son Fab, scFv, Fv, anticuerpos de dominio, semianticuerpos IgG o IgG monovalentes, tal como una IgG de un solo brazo que consiste en una cadena ligera completa, una cadena pesada completa y una cadena Fc adicional que carece de Fd (Fd = VH-CH1), que se puede producir de acuerdo con las técnicas de botones en ojales (u otras partes asimétricas de Fc) para evitar la homodimerización de las cadenas pesadas.

También se pueden usar formatos divalentes, en los que solo una valencia reconoce la diana TNFR1 y la otra valencia reconoce una diana diferente. Por lo tanto, se pueden usar construcciones biespecíficas u oligoespecíficas que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno, siempre que solo un sitio de unión a antígeno se dirija al receptor TNFR1.

El término "anticuerpo de longitud completa" se utiliza para referirse a cualquier molécula de anticuerpo divalente que comprenda al menos la mayor parte del dominio Fc y otros dominios que se encuentran comúnmente en un monómero de anticuerpo natural. Esta expresión se usa en la presente memoria para enfatizar que una molécula de anticuerpo particular no es un fragmento de anticuerpo.

El término "Fv" se entiende en la presente memoria como la región de dominios variables que incorpora el sitio de unión de CDR, p. ej., de VH, VL o VH/VL. El término "Fv", por lo tanto, se aplica particularmente a VH, VL o VH/VL, que es el dominio VH asociado a un dominio VL por una interacción entre la estructura de hoja beta de ambos dominios variables, con o sin un conector.

Además, el término "anticuerpo" incluirá específicamente anticuerpos en forma aislada, que están sustancialmente libres de otros anticuerpos dirigidos frente a diferentes antígenos diana o que comprenden una disposición estructural diferente de los dominios del anticuerpo. Aun así, un anticuerpo aislado puede estar comprendido en una preparación de combinación, que contiene una combinación del anticuerpo aislado, p. ej., con al menos otro anticuerpo, tal como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos con diferentes especificidades, o una combinación de otras sustancias terapéuticamente activas y/o agentes auxiliares.

El término "anticuerpo" se aplicará a los anticuerpos de origen animal, incluida la especie humana, tal como los mamíferos, incluidos los seres humanos, murinos, conejos, cabras, llamas, vacas y caballos, o de aves, tal como las gallinas, término que incluirá en particular los anticuerpos recombinantes que se basan en una secuencia de origen animal, p. ej., secuencias humanas. En particular, el término se aplica a construcciones de anticuerpos que comprenden o consisten en secuencias humanas o humanizadas, lo cual es preferible cuando la construcción de anticuerpo se proporciona con fines farmacéuticos para tratar a un sujeto humano.

En algunos aspectos, pueden usarse los anticuerpos quiméricos con secuencias de origen de diferentes especies, tales como secuencias de origen murino y humano.

El término "quimérico", como se usa con respecto a un anticuerpo, se refiere a aquellos anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otra especie o clase. Normalmente, la región variable de las cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las partes constantes son homólogas a las secuencias de los anticuerpos derivados de otra. Por ejemplo, la región variable puede derivarse de fuentes actualmente conocidas utilizando células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas.

El término "humanizado", como se usa con respecto a un anticuerpo, se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura restante de la inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados, p. ej., por una o más sustituciones de aminoácidos, preferiblemente modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

No hay limitación en cuanto a la técnica de humanización del anticuerpo, siempre que el anticuerpo se una al antígeno deseado. Los ejemplos de humanización incluyen, sin limitación, el injerto de regiones determinantes de la

complementariedad (injerto de CDR) (Jones et al. 1986, Nature 321, 522-525), injerto de residuo determinante 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 desinmunización (Hellendorn et al., 2004, Cancer Cell International 4 (Supl. I), 20).

En un aspecto específico de la presente invención, el anticuerpo descrito en la presente memoria es un anticuerpo humanizado, que contiene secuencias de aminoácidos de origen humano y de origen no humano, p. ej., de roedores.

En una realización preferida, el anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender una región Fc derivada de un anticuerpo humanizado que se puede obtener, p. ej., por tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. En este sentido, el anticuerpo, o al menos un fragmento del mismo, 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 sobre 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 inhibidora.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado que tiene la misma especificidad de unión que el anticuerpo murino H398, pero que se une monovalentemente al huTNFR1 diana, y se deriva preferiblemente de H398, usando el anticuerpo H398 como 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.

El anticuerpo monoclonal H398 de ratón anti-TNFR1 humano se caracteriza por las secuencias VH y VL como se muestra en WO2008113515A2. Tras la humanización, se obtuvieron secuencias de VH y VL humanizadas, que se caracterizan por secuencias como se muestra en WO2008113515A2 (IZI-06.1 VH (SEQ ID 20), IZI-06.1 VL (SEQ ID 21)). El anticuerpo humanizado se ha convertido en una molécula de IgG1 (ATROSAB) que contiene una región Fc modificada deficiente en la mediación de funciones efectoras y que aún se caracteriza por las secuencias VH y VL de IZI-06.1 VH e IZI-06.1 VL. Las secuencias se describen en WO2008113515A2.

El ATROSAB purificado, producido en células CHO, mostró una fuerte unión a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana y de rhesus y fibroblastos embrionarios de ratón transfectados con una proteína de fusión TNFR1 recombinante con una afinidad idéntica al anticuerpo de ratón parental H398. Utilizando moléculas quiméricas de TNFR1 humano/ratón, el epítipo de ATROSAB se mapeó en la región N-terminal (residuos de aminoácidos 1-70) que comprende el primer dominio rico en cisteína (CRD1) y el subdominio A1 de CRD2. *In vitro*, ATROSAB inhibió eficazmente las respuestas típicas mediadas por TNF, tales como la inducción de apoptosis y la activación de la expresión génica dependiente de NFκB, tal como la producción de IL-6 e IL-8.

Dado que el anticuerpo H398 o ATROSAB se caracteriza por una alta avidez, pero una afinidad media cuando se mide para el formato Fab (p. ej., si el sitio de unión a antígeno se proporciona en forma del fragmento Fab respectivo), por QCM en condiciones fisiológicas, el objetivo era mejorar el potencial terapéutico aumentando la afinidad por TNFR1. Sin embargo, tras la maduración de la afinidad de ATROSAB, un derivado divalente completo que se une a TNFR1 con mayor afinidad resultó ser altamente agonista, lo que plantearía un problema para el tratamiento de los pacientes.

El anticuerpo descrito en la presente memoria se une monovalentemente a la diana y, por lo tanto, sorprendentemente supera dicho problema de actividad agonista a altas afinidades, incluso cuando la disociación del anticuerpo del receptor es baja (baja tasa de k_{disoc}).

Preferiblemente, el anticuerpo descrito en la presente memoria tiene una especificidad para unirse al epítipo que comprende o consiste esencialmente en al menos la CRD1 distal a la membrana y el subdominio A1 de CDR2 de huTNFR1.

En una realización específica, el anticuerpo descrito en la presente memoria comprende una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de H398 como se define en las reivindicaciones, CDR de H398 que son como se describen en WO2008/113515A2, confiriendo unión a huTNFR1.

Se entiende que el término "humano" como se usa con respecto a un anticuerpo incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Un anticuerpo humano puede incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. Los anticuerpos humanos incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

El término "anticuerpo" incluye específicamente anticuerpos de cualquier clase o subclase. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a las principales clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término se aplica además a anticuerpos monoclonales o policlonales, específicamente un anticuerpo recombinante, término que incluye todos los anticuerpos y estructuras de anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos que se originan de animales, p. ej., mamíferos, incluido el ser humano, que comprende genes o secuencias de diferente origen, p. ej., anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o anticuerpos derivados de hibridomas. Otros ejemplos se refieren a anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, o anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos o dominios de anticuerpos, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias del gen del anticuerpo a otras secuencias de ADN.

Se entiende que el término "anticuerpo" también se refiere a derivados de un anticuerpo, en particular derivados funcionalmente activos. Se entiende por derivado de anticuerpo cualquier combinación de uno o más dominios de anticuerpo o anticuerpos y/o una proteína de fusión, en la que cualquier dominio del anticuerpo puede estar fusionado o enlazado en cualquier posición de una o más proteínas o productos químicos, tales como otros anticuerpos, p. ej., una estructura de unión que comprende bucles de CDR, un polipéptido receptor, pero también ligandos, proteínas de soporte, enzimas, toxinas y similares. Se puede obtener un derivado del anticuerpo por asociación o unión a otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, enlaces disulfuro, etc. Las otras sustancias unidas al anticuerpo pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de las mismas, p. ej., profármacos o fármacos. Los aspectos específicos se refieren a la unión del anticuerpo a un polímero hidrofílico para obtener un derivado funcionalmente activo de una construcción de anticuerpo acoplado a un polímero hidrofílico, tal como PEG, y/o fusionado a un polipéptido, tal como albúmina sérica humana, transferrina, dominios de unión a Ig, extensiones de polipéptido mimético de PEG, un fragmento Fc de anticuerpo o una variante funcional de cualquiera de los polipéptidos anteriores. Dicho derivado funcionalmente activo es, p. ej., una construcción de anticuerpo PEGilado, HESilado o PSilado. Dicha construcción de anticuerpo se modifica mediante la unión a un resto que prolonga la semivida tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glicosilado, hidroxietilalmidón (HESilación) o ácidos polisiláticos (PSA). Específicamente, el derivado se produce mediante la unión covalente de una o más moléculas del resto que prolonga la semivida.

De acuerdo con un aspecto específico, la construcción de anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una variante de Fc funcionalmente activa, que se deriva de cualquiera de las variantes naturales de FC de IgG humana (SEQ ID 24).

Las variantes de Fc funcionalmente activas pueden obtenerse cambiando la secuencia anterior y se caracterizan por tener una actividad biológica similar a la mostrada por la secuencia respectiva, incluida la capacidad de estabilizar un anticuerpo o conferir una semivida prolongada. Las variantes de Fc preferidas tal como se usan en un anticuerpo descrito en la presente memoria comprenden mutaciones para reducir las funciones efectoras de Fc.

Los derivados funcionalmente activos se producen particularmente por fusión o modificación química covalente que no altera la secuencia primaria de aminoácidos del propio anticuerpo. Los derivados pueden, p. ej., tener propiedades deseadas que incluyen, por ejemplo, prolongar la semivida en circulación, aumentar la estabilidad, reducir el aclaramiento o alterar la inmunogenicidad.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo de huTNFR1 descrito en la presente memoria comprende una etiqueta adicional que permite una interacción específica con un compuesto biológicamente aceptable. No existe una limitación específica con respecto a la etiqueta utilizable, siempre que no tenga un impacto negativo tolerable sobre la unión monovalente del anticuerpo de huTNFR1 a huTNFR1 o la respuesta inmunogénica cuando se administre 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.

El anticuerpo descrito en la presente memoria puede conjugarse con una molécula marcadora o informadora, p. ej., seleccionada 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 los mismos. Los anticuerpos conjugados con etiquetas o moléculas informadoras pueden usarse, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos de diagnóstico.

El anticuerpo descrito en la presente memoria puede conjugarse con otras moléculas que permitan la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (p. ej., ELISA) y estudios de unión.

Se entiende que el término "anticuerpo" también se refiere a variantes de un anticuerpo, incluidos anticuerpos con variantes de CDR funcionalmente activas de una secuencia de CDR parental, y variantes de anticuerpos funcionalmente activas de un anticuerpo parental.

Específicamente, se puede usar un anticuerpo que se deriva de un anticuerpo como se ejemplifica en la presente memoria por sus secuencias CDR y por sus secuencias VH y VL. Por lo tanto, los anticuerpos ejemplificados pueden servir como anticuerpo parental para obtener derivados tales como los definidos en las reivindicaciones.

Los anticuerpos derivados de un anticuerpo parental o una secuencia de anticuerpo, tal como una secuencia CDR o

FR parental, se entienden en la presente memoria particularmente como mutantes o variantes de una secuencia parental obtenida p. ej., *in silico* o ingeniería recombinante o bien por derivatización química o síntesis.

El término "variante" se referirá en particular a anticuerpos, tales como anticuerpos mutantes o fragmentos de anticuerpos, p. ej., obtenidos mediante métodos de mutagénesis, en particular para delecionar, intercambiar, introducir insertos en una secuencia o región de aminoácidos de un anticuerpo específico o derivatizar químicamente una secuencia de aminoácidos, p. ej., en los dominios constantes para modular por ingeniería la estabilidad del anticuerpo, la función efectora o la semivida, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión a antígeno, p. ej., mediante técnicas de maduración por afinidad disponibles en la técnica. Puede emplearse cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluidas las mutaciones puntuales en las posiciones deseadas, p. ej., obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen al azar, p. ej., con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias de anticuerpos. El término "mutagénesis" se refiere a cualquier técnica reconocida en la técnica para alterar una secuencia polinucleotídica o polipeptídica. Los tipos preferidos de mutagénesis incluyen mutagénesis por PCR propensa a errores, mutagénesis por saturación u otra mutagénesis dirigida al sitio.

El término "variante" abarcará específicamente variantes funcionalmente activas.

El término "variante funcionalmente activa" de una secuencia de CDR como se usa en la presente memoria, se entiende como una "variante de CDR funcionalmente activa", y la "variante funcionalmente activa" de un anticuerpo como se usa en la presente memoria, se entiende como "variante de anticuerpo funcionalmente activo". La variante funcionalmente activa significa una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia (un anticuerpo parental o una secuencia parental) por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, o derivatización química de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos, o en uno o ambos de los extremos distales de la secuencia, p. ej., en una secuencia CDR, 1 o 2 aminoácidos N-terminales y/o C-terminales, y/o 1 o los aminoácidos centrales (es decir, en medio de la secuencia CDR), y cuya modificación no afecta, en particular perjudica, la actividad de esta secuencia. En el caso de que un sitio de unión tenga especificidad para un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo aún tendría la misma especificidad de unión o la predeterminada, aunque esto podría cambiarse, p. ej., para cambiar la especificidad fina para un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, la tasa de K_{asoc} o k_{disoc} , etc. Por ejemplo, un anticuerpo madurado por afinidad se entiende específicamente como un anticuerpo variante funcionalmente activo. Por lo tanto, la secuencia de CDR modificada en un anticuerpo madurado por afinidad se entiende como una variante de CDR funcionalmente activa.

Específicamente, una variante funcionalmente activa de un anticuerpo parental se entiende en la presente memoria como

a) que es un fragmento biológicamente activo del anticuerpo, comprendiendo el fragmento al menos el 50 % de la secuencia de la molécula, preferiblemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % y lo más preferiblemente al menos el 97 %, 98 % o 99 %;

b) que deriva del anticuerpo mediante al menos una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos, en el que la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la molécula o parte de ella, tal como un anticuerpo de al menos un 50 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 60 %, más preferiblemente al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, incluso más preferiblemente al menos un 95 % y lo más preferiblemente al menos un 97 %, 98 % o 99 %; y/o

c) que consiste en el anticuerpo o una variante funcionalmente activa del mismo y adicionalmente al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo al polipéptido o la secuencia de nucleótidos.

Específicamente, las construcciones, variantes o derivados de anticuerpos funcionalmente activos como se describe en la presente memoria son funcionalmente activos con respecto a la unión al antígeno TNFR1, en particular la alta afinidad de unión (particularmente según lo determinado por la K_D y las tasas de k_{disoc}), y considerando además evitar cualquier efecto secundario agonista potencial, p. ej., como se determina en un ensayo basado en células. Los ensayos ejemplares para determinar la inhibición de la muerte celular mediada por TNFR1 emplean células Kym-1. Otros ensayos ejemplares para determinar la respuesta inflamatoria mediada por TNF o LTalfa determinan la inhibición de la liberación de IL-6 o IL-8 de las células HeLa o las células HT1080, respectivamente. Dichos ensayos se ejemplifican en la sección de ejemplares.

Pueden obtenerse variantes funcionalmente activas, p. ej., cambiando la secuencia de un anticuerpo parental, p. ej., un anticuerpo que comprende el mismo sitio de unión que cualquiera de los anticuerpos enumerados en las figuras, pero con modificaciones dentro de una región del anticuerpo además del sitio de unión, y preferiblemente tendría sustancialmente la misma actividad biológica que el anticuerpo parental o incluso una actividad mejorada, que incluye la capacidad de unirse específica o selectivamente al antígeno TNFR1, p. ej., con alta afinidad y opcionalmente por una alta asociación y una baja disociación para unirse al antígeno.

La función principal de la construcción de anticuerpo como se describe en la presente memoria es la función como

inhibidor de la interacción TNF-huTNFR1. El término "inhibidor", como se entiende en la presente memoria, es una sustancia que tiene la capacidad de

a) modular (p. ej., reducir o eliminar) la señalización de TNFR1 *in vitro* y/o *in vivo*, y/o

b) inhibir la muerte celular mediada por TNFR1 *in vitro* y/o *in vivo*, y/o

5 c) inhibir la estimulación celular mediada por TNF para liberar citoquinas inflamatorias *in vitro* y/o *in vivo*,

por inhibición de la señalización de TNFR1 o un mecanismo diferente. Dicha capacidad o función se considera específicamente que es la actividad biológica deseada de acuerdo con el objeto de la invención. En particular, el inhibidor como se describe en la presente memoria interfiere con la unión de una o más moléculas de TNF a una o más moléculas de TNFR1 en la superficie celular. Para aplicaciones terapéuticas, sin estar ligado a ninguna teoría, los inhibidores de la interacción TNF-huTNFR1 de la presente invención pueden tener la capacidad de inhibir la señalización de huTNFR1 en presencia de TNF, o la muerte celular mediada por huTNFR1 en presencia de TNF, o inhibir la estimulación celular para liberar citoquinas inflamatorias en presencia de TNF. El tratamiento para un trastorno o enfermedad inflamatoria puede proceder mediante la actividad antiinflamatoria del inhibidor de la interacción TNF-huTNFR1, independientemente del mecanismo subyacente. Al modular a la baja o bloquear la interacción proteína-proteína TNF-huTNFR1, se puede lograr un efecto sobre la enfermedad inflamatoria.

Como se usa en la presente memoria, el término "señalización" y "transducción de la señalización" representa el proceso bioquímico que involucra la transmisión de estímulos extracelulares, a través de receptores de la superficie celular a través de una serie específica y secuencial de moléculas, a genes en el núcleo que dan como resultado respuestas celulares específicas a los estímulos.

La inhibición de la interacción de huTNFR1 puede conducir a una modulación a la baja de los efectos de la señalización o transducción de señales de TNFR1, según se mide *ex vivo* en un ensayo basado en células o *in vivo*, de forma dependiente de la dosis. La actividad funcional del inhibidor o construcciones de anticuerpos y variantes o derivados se caracteriza específicamente por una función inhibidora que inhibe la interacción TNF-huTNFR1 o la interacción LT α -huTNFR1 *in vivo*, como se determina en un ensayo basado en células *ex vivo*. Se puede emplear un ensayo adicional para excluir efectos secundarios sustanciales asociados con la reticulación del receptor TNFR1 que agonizaría la interacción TNF-TNFR1. Un ensayo adecuado es determinar la actividad del anticuerpo o variante en células HeLa o HT1080 en ausencia de actividad estimulante para producir las citoquinas inflamatorias IL-6 o IL-8, respectivamente. Una prueba ejemplar se describe en la sección de ejemplos a continuación.

La inhibición normalmente conduce a una reducción de los efectos de la interacción o actividad de huTNFR1 en al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o al menos un 90 %, o el nivel máximo. Los métodos para producir y caracterizar un inhibidor o anticuerpo descritos en la presente memoria son bien conocidos en la técnica. Específicamente se describen variantes de anticuerpos que se producen y criban en busca de propiedades predefinidas usando uno o más ensayos basados en células que emplean células que expresan huTNFR1 o ensayos *in vivo*. Para tales ensayos, el anticuerpo normalmente se añade exógenamente de modo que las células puedan unirse, p. ej., en presencia y ausencia de TNF para determinar la actividad antagonista y agonista. Estos ensayos normalmente se basan en la función de la inmunoglobulina; es decir, la capacidad del anticuerpo para unirse a huTNFR1 y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo, el bloqueo de la unión de TNF a dichas células, p. ej., en un ensayo de unión competitiva, la inhibición de la unión de TNF/receptor, la reducción de la expresión de citoquinas en presencia o ausencia de TNF, específicamente interleuquinas inflamatorias, tales como IL-6 o IL-8, apoptosis y similares.

Dichos ensayos a menudo implican la monitorización de la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o un gen informador. Para algunos ensayos, es posible que sea necesario añadir células o componentes adicionales, además de las células diana, por ejemplo, complemento sérico o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares. Tales células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

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

La activación transcripcional también puede servir como método para evaluar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede monitorizarse mediante el ensayo de genes naturales o inmunoglobulinas que pueden regularse al alza, por ejemplo, puede medirse la liberación de ciertas interleuquinas o, alternativamente, la lectura puede realizarse a través de una construcción informadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medida de los cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de un anticuerpo descrito en la presente memoria.

El anticuerpo descrito en la presente memoria tiene preferiblemente una actividad antagonista del TNF únicamente

(en particular, sin actividad agonista detectable), por lo que reduce la reacción inflamatoria provocada por un nivel elevado de TNF en la circulación que podría dar lugar a respuestas inflamatorias no deseadas, apoptosis y necrosis, insuficiencia de órganos y choque séptico. El anticuerpo preferido tiene una actividad antagonista correspondiente a una CI_{50} inferior a 100 nM, preferiblemente inferior a 20 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, más preferiblemente en el rango nanomolar de un solo dígito o inferior, medido en un ensayo basado en células que emplea TNF o LTalfa a una concentración de saturación media de la máxima, preferiblemente en el rango de 0,01 - 0,1 nM de TNF y LTalfa, respectivamente, p. ej., por un sistema de prueba como se describe más adelante en los ejemplos siguientes.

Una actividad agonista mimética de TNF potencial se mide preferiblemente en el mismo ensayo basado en células, sin embargo, sin emplear TNF, p. ej., por un sistema de prueba como se describe más adelante en los ejemplos siguientes. El anticuerpo descrito en la presente memoria preferiblemente no tiene actividad agonista significativa, si la incubación de células HeLa o HT1080 en ausencia de TNF da como resultado una inducción marginal o nula de citoquinas, p. ej., niveles elevados de IL-6 o IL-8 de menos de 0,5 ng/ml a concentraciones de al menos 5 nM o alrededor de 10 nM del anticuerpo. Preferiblemente, no hay producción de citoquinas o solo es marginal o negativa, lo que puede determinarse por la cantidad de menos de 10 pg/10⁵ células. En un ejemplo preferido, la expresión y liberación de citoquinas es inferior a 2,5 pg/100.000 células en 18 h. Preferiblemente, la actividad agonista está por tanto por debajo del nivel basal, o menos del 2 % de la respuesta de una concentración de TNF comparable, preferiblemente menos del 1 % de la respuesta de TNF equivalente o máxima.

El anticuerpo descrito en la presente memoria preferiblemente no tiene actividad agonista significativa, si la incubación de células HeLa o HT1080 en ausencia de TNF da como resultado solo una inducción marginal de citoquinas de menos del 2 % de la respuesta de una concentración de TNF comparable, preferiblemente menos del 1 % de la respuesta de TNF equivalente.

Se ha probado particularmente que un anticuerpo ejemplar descrito en la presente memoria no desencadenó la expresión o liberación de citoquinas inflamatorias, tales como IL-6 o IL-8. De ese modo, se pueden evitar las afecciones inflamatorias no deseadas o el daño tisular, a pesar de la alta afinidad para unirse al TNFR1. La reducción de tales reacciones secundarias es particularmente útil para proporcionar preparaciones farmacéuticas para tratar enfermedades crónicas.

El término "sustancialmente la misma actividad biológica", como se usa en la presente memoria, se refiere a la actividad indicada por sustancialmente la misma actividad siendo al menos el 20 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 %, p. ej., al menos el 100 %, o al menos el 125 %, o al menos el 150 %, o al menos el 175 %, o p. ej., hasta un 200 %, o incluso una actividad mayor según lo determinado para el anticuerpo comparable o parental.

Las construcciones de anticuerpo como se describen en la presente memoria son funcionalmente activas con respecto a la unión al antígeno huTNFR1, preferiblemente que tengan una alta afinidad para unirse al antígeno con un K_D inferior a 5×10^{-9} M, o inferior a 4×10^{-9} M, o inferior a 3×10^{-9} M, o inferior a 2×10^{-9} M, o inferior a 10^{-9} M, o inferior a 10^{-10} M. Específicamente, la tendencia a la disociación es baja, con K_{disoc} inferior a $10^{-3} s^{-1}$, o inferior a $5 \times 10^{-4} s^{-1}$, o inferior a $10^{-5} s^{-1}$. Específicamente, la tendencia de asociación es alta, con K_{asoc} inferior a $10^5 M^{-1}s^{-1}$, o $10^6 M^{-1}s^{-1}$.

Las variantes de anticuerpos preferidas siguen reconociendo específicamente la diana huTNFR1, con un posible aumento de la afinidad y/o una disociación más baja y/o una asociación más alta para unirse eficazmente a la diana y mantener la interacción antígeno-anticuerpo durante un período de tiempo prolongado. Aun así, las diferencias en los valores de K_D , K_{disoc} , y/o K_{asoc} pueden ser 1, 2 o 3 logaritmos, p. ej., obtenido por maduración por afinidad del anticuerpo.

La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se caracteriza en términos de la concentración del anticuerpo, en la que la mitad de los sitios de unión del antígeno están ocupados, conocida como la constante de disociación (K_D o K_D). Por lo general, un aglutinante se considera un aglutinante de alta afinidad con una $K_D < 10^{-8}$ M, en algunos casos, p. ej., para fines terapéuticos con afinidades más altas, p. ej., con una $K_D < 10^{-9}$ M, aún más preferido una $K_D < 10^{-10}$ M.

Sin embargo, según un aspecto específico, la afinidad de unión al antígeno es de afinidad media, p. ej., con una K_D inferior a 10^{-7} . Se pueden proporcionar aglutinantes de afinidad media, y se pueden usar específicamente para diseñar por ingeniería una variante madurada por afinidad con las propiedades de afinidad deseadas, que se puede usar como un inhibidor descrito en la presente memoria.

La maduración de la afinidad es el proceso mediante el cual se producen anticuerpos con mayor afinidad por un antígeno diana. Se puede emplear uno cualquiera o más métodos de preparación y/o uso de bibliotecas de maduración por afinidad disponibles en la técnica para generar anticuerpos madurados por afinidad como se describe en la presente memoria. Los ejemplos de dichos métodos y usos de maduración por afinidad, tales como mutagénesis aleatoria, subcultivo de cepas mutadoras bacterianas, mutagénesis dirigida al sitio, selección de puntos críticos mutacionales, mutagénesis parsimoniosa, barajado de anticuerpos, barajado de cadenas ligeras, barajado de cadenas pesadas, mutagénesis de CDR1 y/o CDR1, y métodos para producir y usar bibliotecas de maduración por afinidad susceptibles de implementar métodos y usos como se describe en la presente memoria, incluyen, por ejemplo, los descritos en: Wark y Hudson, 2006, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 657-670.

Con los cambios estructurales de un anticuerpo, incluida la mutagénesis de aminoácidos o como consecuencia de la mutación somática en los segmentos de genes de inmunoglobulinas, se producen variantes de un sitio de unión a un

antígeno y se seleccionan para obtener mayores afinidades. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden mostrar una afinidad de varios logaritmos mayor que un anticuerpo parental. Los anticuerpos parentales individuales pueden someterse a la maduración de la afinidad. Alternativamente, los conjuntos de anticuerpos con una afinidad de unión similar al antígeno diana pueden considerarse como estructuras parentales que se varían para obtener anticuerpos individuales con afinidad madurada o conjuntos con afinidad madurada de tales anticuerpos.

La variante de afinidad madurada preferida de un anticuerpo descrito en la presente memoria exhibe al menos un aumento de 2 veces en la afinidad de unión, preferiblemente un aumento de al menos 5, preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 50 o preferiblemente al menos 100 veces. La maduración de la afinidad puede emplearse en el curso de las campañas de selección empleando bibliotecas respectivas de moléculas parentales, ya sea con anticuerpos que tengan afinidad de unión media para obtener el anticuerpo descrito en la presente memoria. Alternativamente, la afinidad puede incrementarse aún más mediante la maduración de la afinidad del anticuerpo descrito en la presente memoria para obtener los valores altos correspondientes a una K_D inferior a 10^{-10} M, o incluso inferior a 10^{-11} M.

De acuerdo con ciertos aspectos, la afinidad de unión se determina mediante un ensayo ELISA de afinidad. En ciertos casos, la afinidad de unión se determina mediante ensayos BIAcore, ForteBio o MSD. En ciertos casos, la afinidad de unión se determina mediante un método cinético. En ciertos casos, la afinidad de unión se determina mediante un método de equilibrio/solución. En ciertos casos, la afinidad de unión se determina mediante mediciones estándar de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), en particular en condiciones predeterminadas, que se asemejan a las condiciones fisiológicas (aproximadamente 37 °C, densidad de aproximadamente 50 Hz).

El término "variante funcionalmente activa" también incluye variantes alélicas de origen natural, así como mutantes o cualquier otra variante de origen no natural. Como se sabe 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 esencialmente no altera la función biológica del polipéptido.

Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse mediante alteraciones de la secuencia en el polipéptido o la secuencia de nucleótidos, p. ej., por una o más mutaciones puntuales, en las que las alteraciones de la secuencia retienen o mejoran una función del polipéptido o la secuencia de nucleótidos inalterado, cuando se usa como se describe en la presente memoria. Dichas alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones, adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones (conservativas).

Las variantes funcionalmente activas específicas son construcciones de anticuerpos que comprenden variantes de CDR. Una variante de CDR incluye una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido en la región de CDR, donde dicha modificación puede ser una alteración química o parcial de la secuencia de aminoácidos, modificación que permite que la variante retenga las características biológicas de la secuencia no modificada. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de CDR puede ser por delección o sustitución de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1 o 2, o incluso más, hasta 3, 4 o 5 aminoácidos, o por adición o inserción de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1 o 2, o incluso más, hasta 3, 4 o 5 aminoácidos, o por una derivatización química de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1 o 2, o incluso más, hasta 3, 4 o 5 aminoácidos, o combinación de los mismos. Las sustituciones en los residuos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituir un aminoácido hidrofóbico por un aminoácido hidrofóbico alternativo.

Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Los ejemplos de tales familias son los 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 sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

Una mutación puntual se entiende particularmente como la ingeniería de un polinucleótido que da lugar a la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos no modificada en la sustitución o intercambio, delección o inserción de una o más secuencias de aminoácidos individuales (no consecutivas) o dobles de aminoácidos para diferentes aminoácidos.

Algunas mutaciones puntuales en la región del marco aumentarían la capacidad de fabricación, p. ej., mejorando su expresión por una línea de células huésped de producción recombinante. Algunas mutaciones puntuales en la región marco mejorarían la estabilidad in vivo y/o in vitro, p. ej., determinada por su termoestabilidad. En la presente memoria se describen variantes termoestabilizadas que son, p. ej., variantes de una construcción de anticuerpo que comprenden las secuencias VH y VL de IZI06.1 (VH: SEQ ID 20, VL: SEQ ID 21), donde las secuencias de los dominios VH y VL son como se definen en las reivindicaciones.

En la siguiente sección de ejemplos se proporciona un ensayo ejemplar para determinar la termoestabilidad.

Las mutaciones puntuales específicas se refieren al intercambio de aminoácidos de la misma polaridad y/o carga. En este sentido, los aminoácidos se refieren a veinte aminoácidos naturales codificados por sesenta y cuatro codones de tripletes. Estos 20 aminoácidos se pueden dividir en aquellos que tienen cargas neutras, cargas positivas y cargas negativas:

Los aminoácidos "neutros" se muestran a continuación junto con su respectivo código de tres letras y de una sola letra y polaridad:

Alanina: (Ala, A) no polar, neutra;

Asparagina: (Asn, N) polar, neutra;

5 Cisteína: (Cys, C) no polar, neutra;

Glutamina: (Gln, Q) polar, neutra;

Glicina: (Gly, G) no polar, neutra;

Isoleucina: (Ile, I) no polar, neutra;

Leucina: (Leu, L) no polar, neutra;

10 Metionina: (Met, M) no polar, neutra;

Fenilalanina: (Phe, F) no polar, neutra;

Prolina: (Pro, P) no polar, neutra;

Serina: (Ser, S) polar, neutra;

Treonina: (Thr, T) polar, neutra;

15 Triptófano: (Trp, W) no polar, neutro;

Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutra;

Valina: (Val, V) no polar, neutra; e

Histidina: (His, H) polar, positiva (10 %) neutra (90 %).

Los aminoácidos cargados "positivamente" son:

20 Arginina: (Arg, R) polar, positiva; y

Lisina: (Lys, K) polar, positiva.

Los aminoácidos cargados "negativamente" son:

Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo; y

Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

25 El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de anticuerpos y los homólogos descritos 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 polipeptídica específica, después de alinear la secuencia e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los expertos
30 en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Se entiende específicamente que una variante de anticuerpo incluye homólogos, análogos, fragmentos, modificaciones o variantes con un patrón de glicosilación específico, p. ej., producidos por ingeniería de glicosilación, que son funcionales y pueden servir como equivalentes funcionales, p. ej., que se unen a las dianas específicas y con
35 propiedades funcionales.

Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede presentar o no una función efectora Fc. Aunque el modo de acción está mediado principalmente por anticuerpos neutralizantes sin funciones efectoras de Fc, Fc puede reclutar complemento y ayudar a eliminar el antígeno diana, tal como una toxina, de la circulación a través de la formación de complejos inmunes.

40 Los anticuerpos específicos pueden estar desprovistos de un resto Fc activo, por lo tanto, compuestos por dominios de anticuerpo que no contienen una parte Fc de un anticuerpo o que no contienen un sitio de unión al receptor Fc γ , o que comprenden dominios de anticuerpo que carecen de la función efectora Fc, p. ej., por modificaciones para reducir las funciones efectoras de Fc, en particular para anular o reducir la actividad de ADCC y/o CDC. Pueden diseñarse por ingeniería anticuerpos alternativos para incorporar modificaciones para aumentar las funciones
45 efectoras de Fc, en particular para potenciar la actividad de ADCC y/o CDC.

El término "fragmento Fc" o "región Fc", como se usa en la presente memoria, incluirá específicamente aquellos mutantes o variantes funcionalmente activos con propiedades de unión al receptor de Fc deficientes, p. ej., regiones Fc modificadas con ingeniería de glicosilación o aquellas con función efectora modulada a la baja y/o semivida prolongada.

- 5 El término "función efectora", como se usa en la presente memoria, significará 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 similares a receptores de Fc que se unen a inmunoglobulinas. Un receptor de Fc es una proteína que se encuentra en la superficie de ciertas células - incluidas las células asesinas naturales, los macrófagos, los neutrófilos y los mastocitos - que contribuyen a las funciones protectoras del sistema inmune. Hay varios tipos diferentes de receptores de Fc, que se clasifican según el tipo de anticuerpo que reconocen; aquellos que se unen a la clase más común de anticuerpos, IgG, se denominan receptores de Fc-gamma (FcγR o FcγR). La familia de FcγR incluye varios miembros: FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b). Entre las moléculas efectoras también se encuentran las proteínas del complemento, tales como C1q.

- 15 Otro receptor de Fc, el receptor de Fc neonatal (FcRn) también se une a IgG y participa en la conservación y la semivida de este anticuerpo. Como se describe en la presente memoria, 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 un grupo de genes, o un polipéptido, por mutación génica o regulación a la baja de la expresión génica o actividad de los productos de la expresión génica, tales como ácidos nucleicos o polipéptidos, específicamente mediante la reducción de las propiedades de unión, como la afinidad, la avidéz o la especificidad, incluida la inhibición de la unión de un ligando, tal como un ligando efector, al menos en parte. De este modo, se puede obtener un anticuerpo que presenta una ADCC y/o CDC reducida.

- 25 La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es la destrucción de células diana recubiertas con anticuerpos por parte de células con receptores de Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La mayoría de la 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 las células Ramos, incubadas con anticuerpos diluidos en serie antes de la adición de células efectoras recién aisladas. Luego, el ensayo ADCC se incuba adicionalmente durante varias horas y se detecta el % de citotoxicidad. Por lo general, la relación Diana:Efector es de aproximadamente 1:16, pero puede ser de 1:1 hasta 1:50.

- 30 La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es un mecanismo de destrucción de células en el que el anticuerpo unido a la superficie de la célula diana fija el complemento, lo que da como resultado el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana que perfora agujeros en la membrana de la célula diana que da como resultado la lisis celular posterior. El ensayo CDC de uso común sigue el mismo procedimiento que para la determinación de ADCC, sin embargo, con suero que contiene complemento en lugar de células efectoras.

- 35 Una región Fc puede ser deficiente en la mediación de funciones efectoras, preferiblemente una actividad citotóxica modulada a la baja según lo determinado por el ensayo ADCC y CDC, preferiblemente de manera que proporcione una disminución significativa en el porcentaje de citólisis en comparación con un control. La disminución del porcentaje absoluto preferiblemente es superior al 10 %, más preferiblemente superior al 20 %, incluso más preferiblemente superior al 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %. Lo más preferido es que el anticuerpo esté esencialmente libre de al menos una actividad de ADCC o CDC, p. ej., que tenga menos del 10 % de la actividad típica de ADCC y/o CDC en comparación con un anticuerpo nativo (no modificado). El término "esencialmente libre", como se usa en la presente memoria, también se referirá a aquellas variantes de anticuerpos que carecen por completo de tal actividad medida en un ensayo estándar.

- 45 Las mutaciones puntuales específicas dentro de la región Fc son bien conocidas en la técnica para modular a la baja de forma eficaz la función efectora. Se emplean mutaciones específicamente preferidas en la región del sitio de unión en IgG humana para los diferentes receptores Fcγ (FcγR), lo que permitiría anular el 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 233-239 de IgG. Se determinaron segmentos amplios adicionales, p. ej., Gly316-Lys338 para FcγRI humano, Lys274-Arg301 y Tyr407-Arg416 para FcγRIII humano. La estructura cristalina 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 que hace referencia al mapeo de alta resolución de IgG1 humana para receptores FcγR humanos (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA) se proporciona en Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604.

- 55 El anticuerpo o la región Fc pueden glicosilarse o no, dependiendo de las mutaciones específicas o la elección del sistema de expresión, o pueden modificarse mediante ingeniería de glicosilación para obtener un patrón de glicosilación específico.

El término "modificado por ingeniería de glicosilación" con respecto a las secuencias de anticuerpos o la región Fc se referirá a las variantes de glicosilación que tienen ADCC y/o CDC modificadas como resultado de la ingeniería de

glicosilación. Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, y cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de carbohidratos unidas en N, que afectan de manera variable al ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de las proteínas. Los anticuerpos de tipo IgG1 son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos complejos de oligosacáridos bi-antennarios unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando amplios contactos con el esqueleto del polipéptido, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely et al., 1995, *Glycobiology* 5: 813-822). La eliminación de N-glicano en N297, p. ej., mediante mutación de N297, p. ej., a A, o T299 típicamente da como resultado Fc aglicosilado con ADCC reducida.

Se producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre las líneas celulares, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular determinada cultivada en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas normalmente proporciona un anticuerpo aglicosilado que está esencialmente libre de actividad ADCC y/o CDC. Se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisecadas, han mejorado la actividad de ADCC (Umana et al., 1999, *Nature Biotech.* 17:176-180). Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares.

El término "sitio de unión a antígeno" o "sitio de unión" se refiere a la parte de un anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") N-terminales de las cadenas pesada ("H") y/o ligera ("L"), o los dominios variables de las mismas. Tres tramos muy divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, denominados "regiones hipervariables", se intercalan entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como regiones marco. El sitio de unión al antígeno proporciona una superficie que es complementaria a la superficie tridimensional de un epítipo o antígeno unido, y las regiones hipervariables se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". El sitio de unión incorporado en las CDR también se denomina en la presente memoria "sitio de unión de CDR".

El término "antígeno" tal como se usa en la presente memoria es intercambiable con el término "diana" o "antígeno diana" se refiere a una molécula diana completa o a un fragmento de dicha molécula reconocido por un sitio de unión de anticuerpo. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, p. ej., una estructura polipeptídica o de carbohidrato, generalmente denominada "epítipos", p. ej., epítipos de células B o los epítipos de células T, que son inmunológicamente relevantes, pueden ser reconocidos por dicho sitio de unión. El antígeno huTNFR1 es un antígeno que comprende estructuras de receptor que es capaz de unirse específicamente a TNF trimérico o LT α como un receptor de citoquina mono o multimérico en la superficie de la mayoría de las células humanas.

El término "huTNFR1", como se usa en la presente memoria, se referirá al receptor de TNF CD120a TNFR1 (p55/60, superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral TNFRSF1A, miembro 1A [Homo sapiens (humano)], Gene ID: 7132), expresado de manera ubicua en la mayoría de las células humanas.

El término "epítipo", como se usa en la presente memoria, se referirá en particular a una estructura molecular que puede formar completamente una pareja de unión específica o ser parte de una pareja de unión específica a un sitio de unión de un anticuerpo. Un epítipo puede estar compuesto por un carbohidrato, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítipo está comprendido en una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, normalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 5 a 40 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos. Los epítipos pueden ser epítipos lineales o conformacionales. Un epítipo lineal se compone de un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena polipeptídica o de carbohidrato. Los epítipos lineales pueden ser contiguos o superpuestos.

Los epítipos conformacionales se componen de aminoácidos o carbohidratos que se juntan plegando el polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal. Específicamente y con respecto a los antígenos polipeptídicos, un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza por la presencia de dos o más residuos de aminoácidos discretos, separados en la secuencia primaria, pero ensamblados en una estructura consistente en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína/antígeno nativo.

En la presente memoria, el término "epítipo" se referirá en particular al epítipo reconocido por ATROSAB, que es un epítipo que comprende o consiste esencialmente en al menos la CRD1 distal a la membrana y el subdominio A1 de CDR2 de huTNFR1.

El término "expresión" se entiende de la siguiente manera. Las moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada de un producto de expresión tal como p. ej., un anticuerpo como se describe en la presente memoria, y secuencias de control tales como p. ej., un promotor en una unión operativa, pueden usarse con fines de expresión. Los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin

embargo, el ADN relevante también puede integrarse en el cromosoma huésped. Específicamente, el término se refiere a una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula huésped.

El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para un polipéptido o proteína particular tal como p. ej., un anticuerpo. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula o de otro modo media o controla la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden ser del mismo gen o de genes diferentes, y pueden ser del mismo organismo o de organismos diferentes. Los vectores de clonación recombinantes a menudo incluirán uno o más sistemas de replicación para la clonación o la expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, p. ej., resistencia a antibióticos y uno o más casetes de expresión.

Los "vectores" usados en la presente memoria se definen como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de secuencias de nucleótidos recombinantes clonadas, es decir, de genes recombinantes y la traducción de su ARNm en un organismo huésped adecuado.

Un "casete de expresión" se refiere a una secuencia codificante de ADN o a un segmento de ADN que codifica un producto de expresión que se puede insertar en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción del casete están diseñados para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura adecuado. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y luego el vector lo transporta a una célula huésped junto con el ADN del vector transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse "construcción de ADN".

Los vectores de expresión comprenden el casete de expresión y, además, generalmente comprenden un origen para la replicación autónoma en las células huésped o un sitio de integración en el genoma, uno o más marcadores seleccionables (p. ej., un gen de síntesis de aminoácidos o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), una serie de sitios de escisión de enzimas de restricción, una secuencia promotora adecuada y un terminador de la transcripción, componentes que están unidos entre sí de forma operativa. El término "vector", como se usa en la presente memoria, incluye secuencias de nucleótidos que se replican de forma autónoma, así como secuencias de nucleótidos que se integran en el genoma. Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula autónoma de ADN bicatenario que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un vector de plásmido a menudo contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. Específicamente, el término "vector" o "plásmido" se refiere a un vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen extraño) en una célula huésped, para transformar al huésped y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

El término "célula huésped", como se usa en la presente memoria, se referirá a las células objeto primarias transformadas para producir una proteína recombinante particular, tal como un anticuerpo como se describe en la presente memoria, y cualquier progenie de la misma. Debe entenderse que no toda la progenie es exactamente idéntica a la célula parental (debido a mutaciones deliberadas o involuntarias o diferencias en el entorno), sin embargo, dicha progenie alterada está incluida en estos términos, siempre que la progenie retenga la misma funcionalidad que la de la célula originalmente transformada. El término "línea celular huésped" se refiere a una línea celular de células huésped tal como se usa para expresar un gen recombinante para producir polipéptidos recombinantes tales como anticuerpos recombinantes. El término "línea celular", como se usa en la presente memoria, se refiere a un clon establecido de un tipo de célula particular que ha adquirido la capacidad de proliferar durante un período de tiempo prolongado. Dicha célula huésped o línea celular huésped puede mantenerse en cultivo celular y/o cultivarse para producir un polipéptido recombinante.

El término "aislado" o "aislamiento", tal como se usa en la presente memoria con respecto a un ácido nucleico, un anticuerpo u otro compuesto, se referirá a dicho compuesto que ha sido suficientemente separado del entorno con el que se asociaría de forma natural, de modo que exista en forma "sustancialmente pura". "Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta. En particular, las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria también incluyen aquellas que no se producen de forma natural, p. ej., ácidos nucleicos con codones optimizados o ADNc, o sintetizados químicamente.

Asimismo, el anticuerpo aislado, como se describe más adelante en la presente memoria, es específicamente de origen no natural, p. ej., como se proporciona en una preparación combinada con otro anticuerpo o agente activo, combinación que no se produce en la naturaleza, o como un derivado o variante de un anticuerpo natural, o una variante optimizada o madurada por afinidad de un anticuerpo natural, o un anticuerpo con una región marco que está diseñada por ingeniería para mejorar la estabilidad del anticuerpo. Mediante dicha optimización o ingeniería, el anticuerpo comprende una o más estructuras o secuencias o características sintéticas, que no se encontrarían en el contexto del anticuerpo en la naturaleza.

Con referencia a los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, a veces se usa el término "ácido nucleico aislado". Este término, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que se separa de las secuencias

con las que es inmediatamente contigua en el genoma natural del organismo en el que se originó. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector de virus, o integrada en el ADN genómico de una célula procariota o eucariota u organismo huésped. Cuando se aplica al ARN, el término "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se define anteriormente. Alternativamente, el término puede referirse a una molécula de ARN que ha sido suficientemente separada de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un "ácido nucleico aislado" (ya sea ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Con referencia a polipéptidos o proteínas, tales como los anticuerpos aislados descritos en la presente memoria, el término "aislado" se referirá específicamente a compuestos que están libres o sustancialmente libres de material con el que están asociados de forma natural, tales como otros compuestos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (p. ej., cultivo celular) cuando dicha preparación se practica mediante tecnología de ADN recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los compuestos aislados se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aun así estar aislados para fines prácticos - por ejemplo, los polipéptidos o polinucleótidos se pueden mezclar con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia.

El término "recombinante", como se usa en la presente memoria, significará "que está preparado por o el resultado de ingeniería genética". Un huésped recombinante comprende específicamente un vector de expresión o un vector de clonación, o ha sido diseñado por ingeniería genética para contener una secuencia de ácido nucleico recombinante, en particular empleando una secuencia de nucleótidos extraña para el huésped. Una proteína recombinante se produce expresando un ácido nucleico recombinante respectivo en un huésped.

La construcción de anticuerpo descrita adicionalmente en la presente memoria puede ser un anticuerpo recombinante. Con este fin, el término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente memoria, incluye anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinantes combinatorios o biblioteca de secuencias de unión a antígeno de un anticuerpo, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes comprenden anticuerpos diseñados por ingeniería para incluir reordenamientos y mutaciones que ocurren, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como se describe en la presente memoria, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1982).

El anticuerpo descrito en la presente memoria se proporciona preferiblemente como una proteína recombinante producida por un sistema de expresión recombinante que emplea una célula huésped, p. ej., por 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, p. ej., por CHO, HEK o líneas de células huésped de producción humanas.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se han utilizado más comúnmente para la producción de anticuerpos. Además de proporcionar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales altamente productivas y genéticamente estables. Pueden cultivarse a altas densidades en biorreactores simples utilizando medios libres de suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles.

Las células huésped son las más preferidas, cuando se establecen, adaptan y cultivan completamente en condiciones libres de suero y, opcionalmente, en medios que están libres de cualquier proteína/péptido de origen animal.

Unión, reconocimiento o direccionamiento "específico" como se usa en la presente memoria, significa que el aglutinante, p. ej., el anticuerpo o el resto de unión a antígeno, muestra una afinidad apreciable por el antígeno diana o un epítopo respectivo en una población heterogénea de moléculas. Por lo tanto, bajo condiciones designadas (p. ej., inmunoensayo), un aglutinante se une específicamente al antígeno diana 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 avidez de unión alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva generalmente se logra si la constante de unión o la dinámica de unión es al menos 10 veces diferente (entendido como al menos 1 log de diferencia), preferiblemente la diferencia es al menos 100 veces (entendido como al menos 2 log de diferencia), y más preferido al menos 1.000 veces (entendido como una diferencia de al menos 3 log) en comparación con otra diana. La unión diferencial puede determinarse mediante un inmunoensayo, preferiblemente inmunotransferencia, ELISA u otros métodos inmunológicos. La especificidad de una molécula de anticuerpo para una diana particular puede determinarse mediante ensayos competitivos, p. ej., como se describe en Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). La unión selectiva se puede diseñar por ingeniería o mejorar mediante métodos de optimización de anticuerpos

recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas regiones de las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina descritas en la presente memoria pueden someterse a una o más estrategias de optimización, que incluyen transposición de cadenas ligeras, mutagénesis de destino, amalgama de CDR y mutagénesis dirigida de regiones marco y/o CDR seleccionadas.

- 5 El inhibidor descrito en la presente memoria comprende específicamente un anticuerpo que tiene la misma especificidad, o el mismo sitio de unión a antígeno según lo determinado por las secuencias de CDR específicas (SEQ ID 1-6 o variantes de CDR funcionales de las mismas) para unirse a la diana TNFR1, o unirse al mismo epítipo o epítopos superpuestos que el H398 o ATROSAB.

- 10 El uso del término "que tiene la misma especificidad", "que tiene el mismo sitio de unión" o "que se une al mismo epítipo" indica que los anticuerpos monoclonales equivalentes exhiben las mismas o esencialmente las mismas, es decir, características de inmunorreacción (unión) similares y compiten por unirse a una secuencia de unión diana preseleccionada. La especificidad relativa de una molécula de anticuerpo para una diana particular puede determinarse relativamente mediante ensayos de competición, p. ej., como se describe en Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

- 15 En la presente memoria, competición significa una inhibición relativa mayor de aproximadamente el 30 % según lo determinado por análisis de ELISA de competición o por análisis ForteBio. Puede ser deseable establecer un umbral más alto de inhibición relativa como criterio de lo que es un nivel adecuado de competición en un contexto particular, p. ej., cuando el análisis de competición se usa para seleccionar o cribar nuevos anticuerpos diseñados con la función prevista de la unión al antígeno. Así, por ejemplo, es posible establecer criterios para la unión competitiva, donde se detecta al menos un 40 % de inhibición relativa, o al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o incluso al menos el 100%, antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo.

- 20 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, se referirá a un mamífero de sangre caliente, particularmente a un ser humano o un animal no humano. En particular, el uso médico descrito en la presente memoria o el método de tratamiento respectivo se aplica a un sujeto que necesita profilaxis o tratamiento de una afección de enfermedad asociada con la inflamación. El sujeto puede ser un paciente con riesgo de o que padece de una enfermedad inflamatoria, incluida la enfermedad en estadio temprano o en estadio tardío. El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico. Por lo tanto, el término "tratamiento" pretende incluir tanto el tratamiento profiláctico como el terapéutico.

- 25 Un sujeto se trata, p. ej., para la profilaxis o terapia de afecciones de enfermedades inflamatorias. En particular, se trata el sujeto que está en riesgo de enfermedad inflamatoria aguda o crónica o que desarrolla tal enfermedad o recurrencia de la enfermedad, o un sujeto que padece de tal enfermedad inflamatoria.

Específicamente, el término "terapia" se refiere a medidas terapéuticas que pretenden abarcar la administración para curar la enfermedad o reducir los síntomas de la enfermedad.

- 30 Específicamente, el término "profilaxis" se refiere a medidas preventivas que pretenden reducir el riesgo de aparición de la enfermedad, o la recurrencia de la enfermedad.

- 35 El inhibidor descrito en la presente memoria puede regular específicamente la supervivencia celular al inhibir la interacción TNF-TNFR1, previniendo la activación de las vías de señalización aguas abajo del TNFR, minimizando así el programa proinflamatorio que iniciaría en las células inmunes y disminuyendo la patología de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. El uso del inhibidor para prevenir la interacción de TNFR1 con su ligando TNF disminuiría la expansión y supervivencia de las poblaciones de células patógenas y disminuiría la producción de citoquinas proinflamatorias y mejoraría la inflamación mediada por TNF. En el contexto de la enfermedad autoinmune, las interacciones TNF-TNFR ocurren principalmente durante una respuesta inmune. Las funciones de tipos de células inmunes específicas están controladas por las interacciones TNF-TNFR y pueden ser reguladas por el inhibidor como se describe en la presente memoria.

Entre las enfermedades inflamatorias están las indicaciones de un agente terapéutico anti-TNF. Por lo tanto, el inhibidor o anticuerpo descrito en la presente memoria se usa como una alternativa a los agentes terapéuticos anti-TNF convencionales.

- 40 Específicamente, la composición farmacéutica descrita en la presente memoria es adecuada para tratar cualquiera de las siguientes enfermedades o afecciones inflamatorias (o enfermedad inflamatoria) asociadas con la misma, enfermedades que se seleccionan del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn (Morbus Crohn), esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda y crónica, incluyendo apoplejía, enfermedad de Alzheimer y Parkinson.
- 45 Otras indicaciones apropiadas incluyen colitis ulcerosa, pancreatitis, EPOC y otras enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes crónicas, infecciones virales o bacterianas fulminantes agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, síndrome de fiebre periódica, querubismo y cáncer.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", utilizado en la presente memoria de forma intercambiable con cualquiera de los términos "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" de un compuesto, p. ej., un anticuerpo descrito en la presente memoria es una cantidad o actividad suficiente para, cuando se administra al sujeto, obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos y, como tal, una cantidad eficaz o sinónimo de la misma depende del contexto en el que se aplica.

Se pretende que una cantidad eficaz signifique la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir dichas enfermedades o trastornos. En el contexto de la enfermedad, las cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo como se describe en la presente memoria se usan específicamente para tratar, modular, atenuar, revertir o afectar una enfermedad o afección que se beneficia de una inhibición de la interacción TNF-TNFR1.

La cantidad del compuesto que corresponderá a tal cantidad eficaz variará dependiendo de varios factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o huésped que se está tratando, y similares, pero que, sin embargo, puede ser determinada de forma rutinaria por un experto en la técnica.

Una composición farmacéutica preferida es la que se establece en las reivindicaciones, y se describe específicamente en la presente memoria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de huTNFR1 como se definió 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 los mismos.

Como se describe en la presente memoria, un método para tratar a un paciente comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de huTNFR1 definido anteriormente a un paciente que lo necesite. Una cantidad terapéuticamente eficaz típicamente está en el rango de 0,5-500 mg, preferiblemente 1-400 mg, incluso más preferiblemente hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque pueden estar indicadas dosis más altas, p.ej., para el tratamiento de afecciones de enfermedades agudas.

De acuerdo con un aspecto, un anticuerpo descrito en la presente memoria es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, el anticuerpo descrito en la presente memoria se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluidos, pero no limitados a, antagonistas del TNF, agentes antiinflamatorios, citoquinas, factores de crecimiento u otros agentes terapéuticos. El anticuerpo antagonista de TNFR1 puede administrarse de forma concomitante o consecutiva con uno o más regímenes terapéuticos adicionales, preferiblemente con agentes terapéuticos anti-TNF, tales como anticuerpos anti-TNF. El anticuerpo descrito en la presente memoria se administra preferiblemente al paciente como tratamiento de primera línea o como terapia de segunda línea cuando los agentes terapéuticos anti-TNF no fueron eficaces, ya sea como tratamiento agudo o crónico. El uso médico específicamente preferido es para el tratamiento de enfermedades crónicas.

Además, un régimen de tratamiento o prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo descrito en la presente memoria puede consistir en una sola administración o, alternativamente, comprender una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse al menos una vez al año, al menos una vez cada medio año o al menos una vez al mes. Sin embargo, de acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo puede administrarse al sujeto desde aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La duración del período de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, ya sea una enfermedad aguda o crónica, la edad del paciente, la concentración y la actividad del formato de anticuerpo. También se apreciará que la dosificación eficaz utilizada para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir durante el curso de un régimen de tratamiento o profilaxis particular. Los cambios en la dosificación pueden producirse y hacerse evidentes mediante ensayos de diagnóstico estándar conocidos en la técnica. En algunos casos, puede ser necesaria la administración crónica.

Una vez que se identifican los anticuerpos con las propiedades de unión deseadas, dichos anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos, se pueden producir mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, técnicas de hibridoma o tecnología de ADN recombinante.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes se pueden producir, por ejemplo, aislando el ADN que codifica las cadenas de anticuerpos requeridas y transfecando una célula huésped recombinante con las secuencias codificantes para la expresión, usando vectores de expresión recombinantes bien conocidos, p. ej., los plásmidos descritos en la presente memoria o casetes de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de anticuerpos. Las células huésped recombinantes pueden ser células procariotas y eucariotas, tales como las descritas anteriormente.

De acuerdo con un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos puede usarse para la manipulación genética para humanizar el anticuerpo o para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede diseñarse por ingeniería para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune, si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad por la diana. Será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar uno o más cambios de polinucleótidos en el anticuerpo y todavía

mantener su capacidad de unión al antígeno diana.

La producción de moléculas de anticuerpo, por diversos medios, generalmente se comprende bien. La Patente de EE. UU. 6331415 (Cabilly et al.), por ejemplo, describe un método para la producción recombinante de anticuerpos donde las cadenas pesada y ligera se expresan simultáneamente desde un solo vector o desde dos vectores separados en una sola célula. Wibbenmeyer et al. (1999, *Biochim Biophys Acta* 1430:191-202) y Lee y Kwak (2003, *J. Biotechnology* 101:189-198) describen la producción de anticuerpos monoclonales a partir de cadenas pesadas y ligeras producidas por separado, utilizando plásmidos expresados en cultivos separados de células huésped. Varias otras técnicas relevantes para la producción de anticuerpos se proporcionan, p. ej., en Harlow, et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo descrito en la presente memoria puede secuenciarse y la secuencia de polinucleótidos puede luego clonarse en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede mantener en el vector en una célula huésped y la célula huésped se puede expandir y congelar para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular se puede llevar a cabo mediante la clonación de genes de anticuerpos a partir de células B por medios conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia codificante para la producción de un anticuerpo recombinante descrito en la presente memoria.

Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede tener cualquier característica adecuada y comprender cualquier característica adecuada o combinaciones de las mismas. Así, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, en la forma de ADN, ARN o un híbrido de los mismos, y puede incluir bases no naturales y un esqueleto modificado, p. ej., un esqueleto de fósforotioato que promueve la estabilidad del ácido nucleico, o ambos. Preferiblemente, el ácido nucleico puede ser una secuencia con codones optimizados. El ácido nucleico se puede incorporar ventajosamente en un casete de expresión, vector o plásmido descrito en la presente memoria, que comprende características que promueven la expresión, replicación y/o selección deseada en la(s) célula(s) huésped(es) diana. Los ejemplos de dichas características incluyen un componente de origen de replicación, un componente de gen de selección, un componente de promotor, un componente de elemento potenciador, un componente de secuencia de poliadenilación, un componente de terminación y similares, de los cuales se conocen numerosos ejemplos adecuados.

La presente descripción proporciona además las construcciones de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria. Estas construcciones recombinantes se utilizan en relación con un vector, tal como un plásmido, fagémido, fago o vector viral, en el que se inserta una molécula de ADN que codifica cualquier anticuerpo descrito.

Los anticuerpos monoclonales se producen utilizando cualquier método que produzca moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares en cultivo, p. ej., cultivando células huésped eucariotas (mamíferos o insectos) o procariotas (bacterianas) recombinantes. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos de hibridoma de Köhler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497) y el método del hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; y Brodeur et al., 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., Nueva York), p. 51-63).

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden identificarse u obtenerse empleando un método de hibridoma. En tal método, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, para incitar a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Luego, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se prueba para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

A continuación, los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden purificarse a partir de sobrenadantes de hibridomas para realizar más pruebas de su unión específica al antígeno diana y la ingeniería de anticuerpos, p. ej., para diferentes fines diagnósticos o terapéuticos.

Los anticuerpos específicos de huTNFR1, en algunos casos, surgen a través del cribado frente al antígeno huTNFR1. Para aumentar la probabilidad de aislar clones que se unen diferencialmente, se aplicarían presiones selectivas múltiples mediante el cribado procesivo frente a diferentes antígenos o epítomos.

Los métodos de cribado para identificar anticuerpos con las propiedades de unión selectiva deseadas pueden realizarse mediante tecnologías de presentación utilizando una biblioteca que presente secuencias de anticuerpos o secuencias de unión a antígenos de los mismos (p. ej., utilizando fagos, células bacterianas, de levadura o de mamífero; o sistemas de presentación *in vitro* que traducen la información del ácido nucleico en (poli)péptidos

respectivos). La reactividad se puede evaluar en base a ELISA, transferencia Western o tinción de superficie con citometría de flujo, p. ej., utilizando ensayos estándar.

El o los antígenos aislados pueden utilizarse, p. ej., para seleccionar anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos, p. ej., una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos, fagémidos o levaduras.

5 Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor o anticuerpo como se describe en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar de acuerdo con la presente invención como inyección o infusión en bolo o mediante infusión continua. Los vehículos farmacéuticos adecuados para facilitar dichos medios de administración son bien conocidos en la técnica.

10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen cualquiera y todos los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un anticuerpo o composición relacionada o combinación descrita en la presente memoria. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos.

15 En uno de tales aspectos, un anticuerpo se puede combinar con uno o más vehículos apropiados para una vía de administración deseada, los anticuerpos pueden mezclarse, p. ej., con cualquiera de lactosa, sacarosa, almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábica, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina, alcohol polivinílico y opcionalmente además comprimirse o encapsularse para la administración convencional. Alternativamente, un anticuerpo puede disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo puede incluir un material de liberación controlada o un material de retardo de tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

20 Se conocen en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales y se describen, p. ej., en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones, emulsiones o suspensiones y pueden incluir excipientes tales como agentes de suspensión, solubilizantes, tensioactivos, conservantes y agentes quelantes.

25 Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan el inhibidor o anticuerpo descrito en la presente memoria y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables del anticuerpo descrito en la presente memoria se preparan para el almacenamiento mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* son estériles. Esto se logra fácilmente mediante 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.

30 La administración de la composición farmacéutica que comprende un inhibidor o anticuerpo descrito en la presente memoria puede realizarse de diversas formas, incluidas las vías oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraótica, transdérmica, mucosal, tópica, p. ej., geles, pomadas, lociones, cremas, etc., intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, p. ej., empleando tecnología inhalable o sistemas de administración pulmonar, por vía vaginal, parenteral, rectal o intraocular.

35 Los ejemplos de formulaciones que se usan para administración parenteral incluyen aquellas adecuadas para inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión estéril.

De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo descrito en la presente memoria es el único agente terapéuticamente activo administrado a un sujeto, p. ej., tal como una monoterapia que modifica o previene una enfermedad.

40 De acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo descrito en la presente memoria se combina con otras sustancias activas, p. ej., en una mezcla o kit de partes, para tratar a un sujeto que necesita terapia o profilaxis, tal como una terapia de combinación que modifica o previene una enfermedad.

45 La combinación con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales puede incluir un tratamiento estándar, p. ej., antibióticos, inhibidores de la inflamación esteroides y no esteroides, p. ej., metotrexato y/o paracetamol y/u otra terapia basada en anticuerpos. La combinación puede comprender específicamente agentes que se usan para tratar la enfermedad primaria, donde los procesos inflamatorios darán lugar a estados de enfermedad inflamatoria secundaria. La enfermedad primaria es, p. ej., cáncer y la combinación incluiría, p. ej., agentes quimioterapéuticos y/o citostáticos antiproliferativos.

En una terapia de combinación, el anticuerpo se puede administrar como una mezcla o de forma concomitante con uno o más regímenes terapéuticos adicionales, p. ej., ya sea antes, simultáneamente o después de la terapia concomitante.

Las propiedades biológicas del anticuerpo o la preparación farmacéutica respectiva descrita en la presente memoria pueden caracterizarse *ex-vivo* en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Como se sabe en la técnica, los fármacos a menudo se prueban *in vivo* en animales, incluidos, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento frente a una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad, y otras propiedades del fármaco. Los animales pueden denominarse modelos de enfermedades. Las terapias a menudo se prueban en ratones, incluidos, pero no limitados a, ratones desnudos, ratones SCID, ratones con xenoinjerto y ratones transgénicos (incluidos con inactivación y desactivación génica). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo para ser utilizado como agente terapéutico o profiláctico con la semivida, la función efectora, la actividad inhibidora y/o la respuesta inmune apropiada tras la inmunoterapia pasiva. Cualquier organismo, preferiblemente mamíferos, puede usarse para la prueba. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los primates, monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por lo tanto, pueden usarse para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, semivida u otra propiedad del agente o composición en cuestión. En última instancia, se requieren pruebas en seres humanos para su aprobación como fármacos y, por lo tanto, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Por lo tanto, el anticuerpo y las respectivas composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden probarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica o profiláctica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Como se describe en la presente memoria, se produjo una construcción de anticuerpo dirigida a TNFR1 humano sin reactividad cruzada agonista. La inhibición selectiva de TNFR1 brinda la oportunidad de neutralizar la actividad proinflamatoria o las respuestas inflamatorias de TNF. Específicamente, se proporciona un aglutinante monovalente de alta afinidad que, sorprendentemente, no solo evita los efectos secundarios no deseados de un anticuerpo divalente correspondiente, sino que, más sorprendentemente, no se convierte en un agonista tras la reticulación por anticuerpos antiIg humanos (ADA) que se desarrollan potencialmente en el curso de la dosificación repetida típica para programas de tratamiento de enfermedades crónicas.

Un anticuerpo anti-TNFR1 llamado ATROSAB, preparado de acuerdo con WO2012035141A1 es un anticuerpo humanizado producido en células de mamíferos y mostró un comportamiento de unión y neutralización similar al de la IgG H398 de ratón parental. No mostró la actividad agonista que se habría esperado con dicho anticuerpo de longitud completa.

Sin embargo, sorprendentemente, el anticuerpo ATROSAB resultó tener actividad agonista tan pronto como se produjo una variante con mayor afinidad. Por lo tanto, en principio se evitó la maduración por afinidad para reducir los efectos secundarios no deseados. La presente invención se basa ahora en el hallazgo sorprendente de que una construcción de anticuerpo que se une monovalentemente al receptor huTNFR1 no mostraría tal actividad agonista, incluso si la afinidad se incrementó a una K_D inferior a $10^{-8}M$ y específicamente incluso si la K_{disoc} se redujo sustancialmente.

El inhibidor descrito en la presente memoria es un potente antagonista selectivo de TNFR1 y permitirá nuevas opciones terapéuticas para enfermedades en las que están indicadas los agentes terapéuticos anti-TNF o en las que fracasaron los agentes terapéuticos anti-TNF o incluso exacerbaron la progresión de la enfermedad, incluida la esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades metabólicas (diabetes tipo II), síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedades neurodegenerativas agudas (apoplejía) y crónicas (enfermedad de Alzheimer y Parkinson). El inhibidor puede ser una alternativa terapéutica especialmente útil en enfermedades ya conocidas por responder clínicamente al tratamiento anti-TNF y particularmente en aquellas enfermedades donde el bloqueo específico de TNFR1 y el mantenimiento de la función de TNFR2 aparece como un enfoque terapéutico prometedor.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos sin limitarse a ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Unión y Bioactividad de ATROSAB y H398

ATROSAB (anticuerpo de longitud completa producido de acuerdo con WO2012035141) y su anticuerpo de ratón parental H398 (como se describe en WO2008113515A2) presentan una actividad de unión similar a TNFR1 humano con valores de CE_{50} de 0,25 nM y 0,15 nM en ELISA estándar, respectivamente (Fig. 1a). Además, se determinaron afinidades similares (valores de K_D) de 0,35 nM para ATROSAB y 0,23 nM en el caso de H398 mediante tecnología QCM en condiciones de alta densidad de receptores (Fig. 1b y c).

A pesar de una unión similar en ELISA y QCM, H398 mostró una inhibición de 10 a 12 veces más fuerte de la liberación de IL-8 inducida por TNF o LT de las células HT1080 en comparación con ATROSAB (Fig. 2). Teniendo en cuenta que los receptores en ambas mediciones, ELISA y QCM (realizadas en un chip de alta densidad), están sobrerrepresentados en comparación con la situación *in vitro* en las células HT1080 en el ensayo de liberación de IL-8, se decidió repetir las mediciones de QCM utilizando un chip con menor densidad de receptores. Como se muestra

en la Figura 3, se obtuvo un valor de K_D de 4,5 nM para ATROSAB, y se obtuvo un valor de K_D de 1,6 nM para H398 (véase también la Tabla 1). Curiosamente, mientras que el valor de K_D de ATROSAB y H398 difirió por un factor de 2,8, la tasa de asociación (k_{asoc}) de ATROSAB fue 2,6 veces más rápida que la k_{asoc} de H398 y la tasa de disociación (k_{disoc}) de H398 fue aproximadamente 7,6 veces más lenta que la disociación de ATROSAB (Fig. 3, Tabla 1). Por lo tanto, al competir con TNF o LT por la unión al receptor, ATROSAB (tasa de asociación más rápida) ocupa los receptores libres más rápido y H398 (tasa de disociación más lenta) bloquea los receptores ocupados durante más tiempo.

Teniendo en cuenta que en el marco del ensayo estándar de liberación de IL-8 (véase a continuación), los receptores son la base de la internalización continua y los receptores internalizados aún median la señalización, el anticuerpo que permanece más tiempo unido al receptor (tasa de disociación más lenta) podría ser el inhibidor más fuerte. Podría excluirse un efecto dependiente del pH debido a las condiciones acidificadas en el compartimento endosomal, ya que la unión de ATROSAB y H398 a TNFR1-Fc humano en ELISA no difirió significativamente entre sí en experimentos realizados a pH 5,4, pH 6,4, pH 7,4 y pH 8,4 (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió invertir esfuerzos en el desarrollo de variantes de ATROSAB "maduradas en tasa de disociación".

Tabla 1. Unión y Bioactividad de ATROSAB y H398

	ATROSAB	H398	Factor
CE ₅₀ , ELISA [nM]	0,25	0,15	1,7
K _D , chip de alta densidad [nM]	0,35	0,23	1,5
Cl ₅₀ , TNF [nM]	42	4,1	10
Cl ₅₀ , LT [nM]	7,6	0,65	12
K _D , chip de baja densidad [nM]	4,5	1,6	2,8
k _{disoc} , chip de baja densidad [s ⁻¹]	4,7 × 10 ⁻³	6,2 × 10 ⁻⁴	7,6

Ejemplo 2: Presentación en Fagos Parte 1 - Mutagénesis Dirigida al Sitio y Selección en Equilibrio

En trabajos anteriores (Tesis doctoral de Kirstin Zettlitz, 2010), ATROSAB se sometió a maduración por afinidad utilizando bibliotecas de presentación en fagos de CDRH1, CDRH2, CDRL1 y CDRL2 aleatorizados individualmente. Dentro de estas CDR, se aleatorizaron las posiciones identificadas en una estructura modelo de IZI06.1 para exponerse en el sitio de unión a antígeno. Las selecciones se realizaron en condiciones de equilibrio utilizando huTNFR1-Fc biotinilado soluble en combinación con Dynabeads magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las condiciones de selección se presentan en la Tabla 2. Aunque se identificaron residuos preferidos para las cuatro CDR, solo se encontró que las mutaciones en CDRH2 (Tabla 3) mostraban algunas mejoras en la unión a TNFR1. ScFvIG11 se aisló de la ronda 6 y reveló la unión a TNFR1-Fc con una K_D dos veces mayor en comparación con scFvIZI06.1 (ATROSAB) según lo determinado por QCM. Se seleccionó ScFvIG11 para más experimentos debido a su constante de disociación k_{disoc} casi tres veces reducida de $2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en comparación con scFvIZI06.1 ($7,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), lo que indica una disociación más lenta del anticuerpo del complejo anticuerpo-receptor. En la Figura 4 se muestra una alineación de secuencias de scFvIZI06.1 y scFvIG11.

Tabla 2. Condiciones para la selección en equilibrio usando antígeno biotinilado.

Ronda	Antígeno (nM)	Incubación	Fago	Perlas	Lavado, MPBST (PBS)
0	moR1, 20 nM	1 h, RT	10 μl = 2×10^{11}	500 μg	=> usar sobrenadante para la selección
1 ^{at}	10 nM	4 h, RT	10 μl = 2×10^{11}	500 μg	3 (1) ×
2 ^a	10 nM	o/n, 4 °C; 1 h, RT	10 μl = 4×10^{10}	500 μg	15 (5) ×
3 ^a	1 nM	o/n, 4 °C; 1h, RT	1 μl = 4×10^9	100 μg	20 (10) ×

Ronda	Antígeno (nM)	Incubación	Fago	Perlas	Lavado, MPBST (PBS)
4 ^a	1 nM	3 h, RT	1 μ l = 4×10^9	100 μ g	10, 1h, RT (10) $\times$
5 ^{al}	0,1 nM	o/n, 4 °C; 1h, RT	1 μ l = 4×10^9	100 μ g	10, 2h, RT (10) $\times$
6 ^{al}	0,1 nM	3 d, 4 °C; 1h, RT	1 μ l = 4×10^9	100 μ g	10, 2h, RT (10) $\times$

Tabla 3: Posiciones para mutagénesis dirigida a sitio, biblioteca L2a

CDRH2 (Kabat)	502a3456789602345
scFvIZI06.1	EIYPYSGHAYYNEKFKA
Residuos aleatorizados	X.X.XX.X.X..X....
Diversidad calculada	2,68 $\times 10^8$
tamaño de la biblioteca	2,57 $\times 10^8$
Funcionalidad	73 %

Ejemplo 3: Presentación en Fagos Parte 2 - Mutagénesis Aleatoria y Selección Competitiva

- 5 La biblioteca utilizada para los siguientes experimentos de selección se generó mediante PCR propensa a errores de la secuencia completa que comprende VH y VL de scFvIG11 ($6,2 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias). Diez clones individuales analizados revelaron una tasa de mutagénesis global de 7,5 mutaciones por kilopar de bases (7,5/kpb). Dentro de las CDR, que cubren el 25 % de la secuencia completa de scFv (180 de 729 pb), se observaron 15 de 55 mutaciones (27 %), lo que indica una distribución de mutaciones bastante equitativa.

10 Selección del Clon Madurado por Afinidad scFvT12B

- Se realizó una ronda de selección negativa usando TNFR2 humano antes del reconocimiento y selección frente a TNFR1 humano, para retener la selectividad del receptor durante el proceso de selección. Se seleccionaron fragmentos de scFv presentados con comportamiento de unión mejorado, empleando TNFR1-Fc humano inmovilizado en inmunotubos. Los cambios de unión totales del grupo de selección se registraron mediante ELISA de fagos policlonales después de cada ronda, lo que demuestra una mejora de aproximadamente dos veces después de tres rondas de selección (Fig. 5a, las condiciones de selección se revisan en la Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones de Selección

Ronda	Antígeno	Fagos	Competición
1	1 μ g/ml	10 μ l	-
2	0,1 μ g/ml	1 μ l	-
3	0,01 μ g/ml	1 μ l	10 nM*
* Se usó TNFR1 humano sin marcar en solución para competir tanto para la selección en DynaBeads como en Inmunotubos			

- 20 Los fagos candidatos, que mostraron la unión más fuerte a TNFR1 humano en ELISA (Tabla 5), se expresaron como fragmentos scFv solubles y se sometieron a análisis cinético por QCM, utilizando un chip sensor con una densidad de receptor moderada. El clon scFvT12B reveló la liberación más lenta del receptor, indicada por el valor de k_{disoc} más

bajo (Fig. 5b, Tabla 5).

Tabla 5. Valores relativos de CE_{50} y k_{disoc} de candidatos de la Biblioteca de Presentación en Fagos EP03 en comparación con scFvIZI06.1

Clon	CE_{50}	k_{disoc}
IZI06.1	1	1
IG11	n.d.	0,31
T12B	0,017	0,25
B12B	0,021	0,77
T2A	0,023	0,47
T1C	0,009	0,76
B8E	0,046	0,41
T12E	0,047	0,50
T7B	0,062	0,47
T9H	0,041	0,38
B6F	0,251	0,66
T10D	0,006	0,72

- 5 En conjunto, scFvT12B mostró las mejores características de unión en el cribado de la tasa de disociación por QCM, que se supone que es el atributo clave para la mejora del bloqueo del receptor. La secuencia de ADN de scFvT12B se cambió en tres posiciones en comparación con scFvIG11. Q1H y T53S en la CDRH2 del dominio variable de la cadena pesada (VH) así como S91G en la CDRL3 del dominio variable de la cadena ligera (VL, Fig. 4).

Caracterización de scFvT12B

- 10 Los fragmentos de anticuerpos solubles scFvT12B, scFvIZI06.1 y scFvIG11 se produjeron en el periplasma de *E. coli* TG1 y la expresión adecuada se confirmó mediante SDS-PAGE, donde se pudieron observar contaminaciones menores en las muestras purificadas (Fig. 6a). La unión dependiente de la concentración a TNFR1 humano se demostró en ELISA, revelando valores de EC_{50} de 3,8 nM, 2,6 nM y 2,0 nM para scFvIZI06.1, scFvIG11 y scFvT12B, respectivamente (Fig. 6b, Tabla 6). Por lo tanto, scFvT12B mostró una unión mejorada en las condiciones aplicadas
- 15 de 1,3 veces en comparación con scFvIG11. Los valores de K_D , determinados por QCM, fueron 28,9 nM para scFvIZI06.1, 24,9 para scFvIG11 y 6,0 para scFvT12B, lo que representa una unión mejorada 4,1 veces de scFvT12B en comparación con scFvIG11 (Fig. 6c, Tabla 6). El cambio en la afinidad se originó a partir de una constante de tasa de asociación mejorada (K_{asoc} incrementada 2,1 veces) y de tasa de disociación (k_{disoc} disminuida 2,0 veces, Tabla 6). Finalmente, scFvT12B bloqueó la liberación de interleuquina-8 inducida por TNF *in vitro* con una actividad antagonista
- 20 mejorada en comparación con scFvIZI06.1 y scFvIG11 (Fig. 6d). Los datos obtenidos no pudieron converger hacia una curva de inhibición estándar debido a una señal creciente a altas concentraciones de scFv aplicado. Sin embargo, las concentraciones aproximadas de la mitad de la inhibición máxima reflejaron un bloqueo aproximadamente siete veces más fuerte de TNFR1 humano por scFvT12B en comparación con scFvIG11 (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización de scFvT12B en comparación con scFvZI06.1 y scFvIG11. La mejora se indica como factor con respecto a los valores de scFvIG11.

	scFvZI06.1	scFvIG11	scFvT12B	Mejorado
CE ₅₀ (nM)	3,8	2,6	2,0	1,3
k _{asoc} (M ⁻¹ s ⁻¹)	5,0 × 10 ⁵	1,5 × 10 ⁵	3,0 × 10 ⁵	2,1
k _{disoc} (s ⁻¹)	1,4 × 10 ⁻²	3,6 × 10 ⁻³	1,8 × 10 ⁻²	2,0
K _D (nM)	28,9	24,9	6,0	4,1
Cl ₅₀ (nM)*	~200	~300	~45	~6,7
*Valores de Cl ₅₀ aproximados, que se originan a partir de la evaluación de los datos de II-8 obtenidos tras la exclusión de los últimos 1-2 puntos de datos.				

Ejemplo 3: Humanización Repetida de H398

- 5 Como se mencionó anteriormente, H398 demostró ser más eficaz en el bloqueo de las respuestas celulares mediadas por TNF en comparación con ATROSAB (Zettlitz et al. 2010), por lo que se recapituló el proceso de humanización que dio lugar a scFvZI06.1 (ATROSAB). Para identificar genes alternativos de la línea germinal humana, se priorizó la humanidad sobre la identidad de secuencia y se usaron clones de homología bastante baja con scFvH398 para la humanización repetida de VH y VL. Los genes, denominados 3-11*01 y 1-39*02, fueron seleccionados debido a su
- 10 profunda humanidad (Abhinandan y Martin 2007), indicado por puntuaciones z positivas de mayor valor (Tabla 7). Las secuencias CDR del anticuerpo murino H398 se transfirieron al marco de las secuencias de la línea germinal seleccionadas, dando como resultado el fragmento de anticuerpo scFvFRK13. El análisis de las estructuras canónicas del scFv recién generado utilizando moldes SDR generados automáticamente (Copyright® 1995, Andrew C.R. Martin, UCL) indicó aminoácidos atípicos en la posición H71 y L2. Por tanto, estos residuos fueron sustituidos por los
- 15 aminoácidos utilizados para la generación de ATROSAB (VH: R71A, VL: I2V). Los cambios en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del scFv humanizado antes (scFvFRK13.1) y después (scFvFRK13.2) de la sustitución de aminoácidos, en comparación con scFvZI06.1, se revisan en una alineación en la Figura 7.

Tabla 7. Humanización de H398.

Locus	Clon	Identidad	Puntuación BLAST	Puntuación z
H398-VH	-	-	-	-2,023
1-69*08	DP88	60,2 %	127	0,317*
3-11*01	DP35	45,9 %	109	1,987
Locus	Clon	Identidad	Puntuación BLAST	Puntuación Z
H398-VL	-	-	-	-1,829
2D-28*01	DPK15	79,0 %	161	-1,401*
1-39*02	DPK9	54,0 %	109	1,204
*gen de la línea germinal utilizado para el IZI06.1 humanizado (ATROSAB scFv)				

20 Expresión y Caracterización de scFvFRK13

Además de scFvFRK13.1 y scFvFRK13.2, se clonaron y produjeron combinaciones de sus dominios variables de

cadena ligera y pesada y combinaciones con la cadena ligera o pesada de scFvT12B (Fig. 8). Los fragmentos scFv se analizaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras, demostrando expresión entera y purificación limpia solo para scFvFRK13.5 y scFvFRK13.7 (Fig. 8b). Se observaron bandas de mayor y menor peso molecular para todas las demás construcciones, lo que indica contaminaciones de las muestras de proteínas o productos de degradación. Además, solo scFvFRK13.5 y scFvFRK13.7 mostraron picos limpios en la cromatografía de exclusión por tamaño, correspondientes al peso molecular calculado (Fig. 8c). Se detectaron señales más bajas de tiempo de retención más corto para ambas proteínas, lo que posiblemente represente la existencia de scFv dimérico o agregados de orden superior. Estos hallazgos indican que los dominios VH recién humanizados dan como resultado moléculas de scFv inestables.

La unión al receptor de scFvFRK13.1 - 13.8 se analizó adicionalmente en ELISA (Fig. 9a), usando los anticuerpos scFv T12B e IZI06.1 como proteínas de control. Mientras que scFvFRK13.5, scFvFRK13.7 y scFvT12B se unieron a TNFR1 humano con valores de EC_{50} comparables de alrededor de 1 nM (Tabla 8), el conjunto restante de scFv mostró una unión débil solo a concentraciones superiores a 100 nM. De manera similar, scFvFRK13.5, scFvFRK13.7 y scFvT12B inhibieron la liberación de IL-8 inducida por TNF de las células HT1080 con valores de CI_{50} de alrededor de 300 nM. La proteína de control scFvIZI06.1 mostró bloqueo de TNFR1 con un valor de CI_{50} de 932 nM (Fig. 9b, Tabla 8). Además, se investigó la estabilidad térmica mediante dispersión de luz dinámica. ScFvFRK13.5 y scFvFRK13.7 mostraron temperaturas de fusión de 63 °C y 65 °C, en comparación con 59 °C y 55 °C de scFvIZI06.1 y scFvT12B, respectivamente (Fig. 10). Cabe destacar que scFvIZI06.1 ya mostró un aumento en las tasas de conteo promedio a temperatura más baja, lo que indica una desestabilización parcial de la estructura de la proteína. Por el contrario, las señales de scFvT12B, scFvFRK13.5 y scFvFRK13.7 fueron casi constantes por debajo del punto de fusión, revelando una estabilidad mejorada también en el rango de temperatura más bajo.

Tabla 8. Caracterización de fragmentos de anticuerpos scFvH398 humanizados.

	H398	IZI	T12B	FRK13.5	FRK13.7
Puntuación Z VH	-2.023	-0,419	-0,500	0,760	0,698
Puntuación Z VL	-1.829	-1,172	-1,225	0,188	0,051
CE_{50} (nM)	n.d.	3,07	1,14	1,06	1,09
CI_{50} (nM)	n.d.	932	309	367	284
T_m (°C)	n.d.	59	55	63	65

En resumen, los anticuerpos scFv que contenían un dominio VH humanizado recientemente no pudieron expresarse correctamente y parecían destruir la unión al TNFR1 humano. ScFvFRK13.7, que contiene el dominio VL rehumanizado y el dominio VH de scFvT12B, se expresó con suficiente pureza y se unió a huTNFR1-Fc con la misma fuerza que el anticuerpo scFvT12B de Fv monocaténario "madurado por tasa de disociación". Además, scFvFRK13.7 reveló una estabilidad térmica mejorada.

Ejemplo 4: Conversión de scFvFRK13.7 en una IgG y un Fragmento Fab

Los dominios variables de cadena ligera y pesada de scFvFRK13.7 se introdujeron en el fondo de ATROSAB IgG y ATROSAB Fab mediante técnicas estándar de clonación y PCR. IgG-FRK13.7 y Fab-FRK13.7 se denominan en lo que sigue IgG13.7 y Fab13.7, respectivamente. Las proteínas se produjeron de forma transitoria en células HEK293T y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A (IgG13.7) o anticuerpo (Fab13.7). IgG13.7 se sometió a una SEC preparativa adicional (FPLC), debido a picos menores a mayor peso molecular. La expresión y la integridad de la proteína se monitorizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 11a) y no reductoras (Fig. 11c), así como mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Fig. 11c). ATROSAB y FabATROSAB (FabATR) se utilizaron como controles en todos los experimentos. Las cuatro proteínas mostraron bandas que se correlacionaban con el peso molecular calculado durante la electroforesis. De manera similar, los picos de absorción observados en la filtración en gel confirmaron preparaciones de proteínas homogéneas, todas con pesos moleculares aparentes de acuerdo con los tamaños esperados. Fab13.7 e IgG13.7 retuvieron su especificidad por TNFR1 humano en ELISA en comparación con TNFR2 humano y ambos receptores de TNF de ratón (Fig. 12).

Unión de Anticuerpos FRK13.7 a TNFR1 Humano

IgG13.7 y Fab13.7 se unieron a TNFR1-Fc humano en ELISA con valores de CE_{50} de 1,4 nM para Fab13.7, así como 0,76 nM en el caso de IgG13.7. Las proteínas de control ATROSAB y FabATR mostraron una unión 1,4 veces y 8,7 veces más débil en comparación con IgG13.7 y Fab13.7, respectivamente, indicado por valores de CE_{50} más altos

(Fig. 13).

Además, la evaluación de la dinámica de unión se realizó mediante una microbalanza de cristal de cuarzo, utilizando chips sensores de densidad de receptor moderada (86 Hz) o alta (184 Hz). El anticuerpo de control ATROSAB reveló una clara interacción bifásica con TNFR1-Fc humano a una densidad de receptor moderada, compuesta de proporciones con afinidad alta o baja, como se representa por valores de K_D de 0,38 nM y 78 nM, respectivamente (Fig. 14a, Tabla 9). Por el contrario, IgG13.7 mostró valores de k_{disoc} en un análisis de unión OneToTwo en el rango de $1,77 \times 10^{-4}$ a $9,30 \times 10^{-4}$ (datos no mostrados), lo que da como resultado cantidades muy bajas de proteína disociada y, por lo tanto, diferencias apenas detectables entre subpoblaciones de unión y disociación monovalente y bivalente. Por lo tanto, IgG13.7 se probó en un chip de alta densidad, donde la interacción bivalente dominaba claramente y la contribución de la interacción monovalente a la señal de unión podía ignorarse en gran medida, lo que permitía la evaluación en un análisis OneToOne. El valor determinado de K_D de 0,11 nM reflejó una mejora de 3,5 veces en comparación con ATROSAB considerando la situación de unión bivalente (Fig. 14c). La proteína de control monovalente FabATR se disoció casi por completo del chip de densidad de receptor moderada durante el período de detección (cinco minutos), revelando una constante de tasa de disociación (k_{disoc}) de $1,5 \times 10^{-2} s^{-1}$ y un valor de K_D de 30 nM (Fig. 14b). Por el contrario, la disociación de Fab13.7 del complejo anticuerpo-receptor fue considerablemente más lenta, indicado por el valor k_{disoc} de $7,3 \times 10^{-4} s^{-1}$, mientras que la constante de tasa de asociación (k_{asoc}) era casi idéntico en comparación con FabATR. Esto dio como resultado una afinidad 19 veces mayor de Fab13.7 por TNFR1 humano con un valor de K_D de 1,6 nM (Fig. 14d, Tabla 9).

Tabla 9. Determinación de la Afinidad de IgG13.7 y Fab13.7

	ATROSAB	IgG13.7	FabATR	Fab13.7
Bmáx1 (Hz)	16,8		6,36	8,93
Bmáx2 (Hz)	10,73	55,93		
$k_{asoc1} (M^{-1}s^{-1})$	$2,82 \times 10^5$		$5,01 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5$
$k_{disoc1} (s^{-1})$	$2,19 \times 10^{-2}$		$1,50 \times 10^{-2}$	$7,32 \times 10^{-4}$
K_D1 (nM)	78		30	1,6
$k_{asoc2} (M^{-1}s^{-1})$	$1,06 \times 10^6$	$5,35 \times 10^5$		
$k_{disoc2} (s^{-1})$	$4,07 \times 10^{-4}$	$5,92 \times 10^{-5}$		
K_D2 (nM)	0,38	0,11		

Por lo tanto, la construcción de anticuerpo monovalente de ATROSAB (FabATR) ha demostrado ser un aglutinante muy inferior para el huTNFR1 en comparación con Fab13.7. La afinidad de la unión de scFv IZI-06.1 a huTNFR1 es similar a FabATR, si la afinidad de scFv se mide en el formato Fab. Aunque las mediciones de scFv IZI-06.1 de la técnica anterior pueden mostrar mejores resultados (debido a los efectos de avidz de las moléculas de scFv dimerizadas), la afinidad de unión (en el formato Fab) es muy inferior e iguala a FabATR.

Bioactividad in vitro y Farmacocinética de Proteínas Derivadas de scFvFRK13.7

Para investigar la influencia de la maduración de la afinidad y la rehumanización en el anticuerpo antagonista ATROSAB *per se*, se probó el potencial de IgG y Fab derivados de scFvFRK13.7 para la inducción de la liberación de interleuquina-8 y 6 de células HT1080 y HeLa, respectivamente. ATROSAB, que se incluyó como control, mostró la activación del receptor marginal descrita solo en el caso de IL-8 (Richter et al. 2013), en los experimentos de liberación de IL-6 realizados no se observó estimulación por encima del fondo celular (Fig. 15b y c). La proteína de control monovalente FabATR no estimuló la liberación de IL-8 ni de IL-6 del tipo celular respectivo. De manera consistente, no se observó una mayor liberación de interleuquina inducida por Fab13.7 en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, IgG13.7 claramente estimuló la liberación de IL-8 e IL-6, lo que dio lugar a niveles de interleuquina del 20 % al 87 % en comparación con el efecto de TNF 33 nM, que fue alrededor de la respuesta máxima estimulada por TNF en experimentos anteriores.

Curiosamente, la liberación de IL-8 de las células HT1080 desencadenada por TNF 0,1 nM fue inhibida por ATROSAB y FabATR con valores de CI_{50} comparables de 118 nM y 151 nM, respectivamente (Fig. 16a). De manera similar,

ATROSAB y FabATR revelaron una inhibición igualmente fuerte de la liberación de IL-6 de las células HeLa, provocada por TNF 0,1 nM (Fig. 16b, Tabla 10). Debido a su actividad agonista, no se determinó una concentración de la mitad de la inhibición máxima (Cl₅₀) de IgG13.7. Por el contrario, Fab13.7 inhibió la liberación de IL-8 e IL-6 en respuesta a TNF 0,1 nM de manera dependiente de la dosis con valores de Cl₅₀ de 18,7 nM y 31,4 nM, respectivamente, lo que revela una neutralización de TNF mejorada de 5,8 veces a 6,2 veces en comparación con el IgG ATROSAB de longitud completa.

Además, se investigó el potencial de la IgG de longitud completa y el fragmento Fab que se origina de scFvFRK13.7 para promover o inhibir la muerte celular mediada por TNFR1 en células Kym-1. De manera consistente con las proteínas de control ATROSAB y FabATR, la estimulación por Fab13.7 no condujo a ninguna citotoxicidad detectable (Fig. 17a). Por otro lado, IgG13.7 erradicó casi el 100 % de las células Kym-1 en un amplio rango de concentraciones, equivalente al control positivo TNF, que se utilizó a 33 nM. Para investigar la capacidad inhibidora del Fab13.7 no agonista, se incubaron células Kym-1 con TNF 0,01 nM, matando alrededor del 90 % de las células en un solo tratamiento. Fab13.7 y las proteínas de control ATROSAB y FabATR inhibieron la muerte celular mediada por TNF con valores de Cl₅₀ de 4,7 nM, 24 nM y 37 nM, respectivamente, lo que confirma las observaciones de los ensayos de liberación de interleuquinas (Fig. 17b, Tabla 10).

Tabla 10. Bioactividad de los Anticuerpos ATROSAB y FRK13.7

	TNF (33 nM)	ATROSAB	FabATR	IgG13.7	Fab13.7	Células
Estimulación de TNFR1						
Liberación de IL-8 (pg/ml)	20.850	240	128	4231	138	137
Liberación de IL-6 (pg/ml)	1.667	231	179	1.454	101	191
Citotoxicidad (%)	92	-	-	hasta 100	-	-
Inhibición de respuestas celulares a TNF 0,1 nM (IL-6, IL-8) o 0,01 nM (citotoxicidad)						
Cl ₅₀ , IL-8 (nM)		-		118	151	19
Cl ₅₀ , IL-6 (nM)		-		179	145	31
Cl ₅₀ , citotoxicidad (nM)		-		24	37	4,7

Con el fin de evaluar el riesgo de una actividad potencialmente agonista de Fab13.7 en presencia de anticuerpos específicos de fármacos, se probó la bioactividad de Fab13.7 en células HT1080 en combinación con un suero policlonal anti Fab humano aislado de cabra. En ELISA de unión estándar, se pudo mostrar la unión del suero de cabra específico de Fab humano a Fab13.7 (Fig. 18a); sin embargo, no se detectó una actividad estimulante incrementada por encima del fondo celular de Fab13.7 junto con 64 µg/ml del suero en el ensayo de liberación de IL-8 (Fig. 18b). Sin embargo, ATROSAB mostró una inducción claramente aumentada de IL-8 en respuesta al tratamiento conjunto con el suero anti Fab humano (Fig. 18b). Se obtuvieron resultados similares en experimentos previos usando ATROSAB junto con un anticuerpo anti Fc humano (sin publicar, datos no mostrados).

Las propiedades farmacocinéticas de FabATR y Fab13.7 se analizaron usando ratones C57BL/6J transgénicos que tenían el dominio extracelular de TNFR1 reemplazado por el homólogo humano (Fig. 19). Las semividas iniciales de alrededor de 0,25 horas indicaron una distribución rápida en el cuerpo. Ambos fragmentos Fab se eliminaron de la sangre rápidamente con semividas terminales de 1,7 horas para FabATR y 1,56 horas en el caso de Fab13.7. Estos resultados revelaron un perfil farmacocinético inalterado del Fab13.7 antagonista de TNFR1 evolucionado, en comparación con el fragmento Fab de ATROSAB. En la Tabla 11 se muestra un resumen de los datos.

Tabla 11. Análisis Farmacocinético de FabATR y Fab13.7

Construcción	Semivida inicial [h]	Semivida terminal [h]	Área bajo la curva [%*h]	
			% de 3 min	% de ID
FabATR	0,24 ± 0,02	1,56 ± 0,07	45,24 ± 2,68	51,91 ± 6,04
Fab13.7	0,25 ± 0,06	1,7 ± 0,15	41,99 ± 5,53	36,04 ± 5,23

Ejemplo 5: Derivado PEGilado de Fab13.7

Con el fin de eludir el tiempo de circulación bastante corto de Fab13.7 *in vivo*, varias estrategias, destinadas a aumentar el radio hidrodinámico por un lado y permitir el reciclaje de fármacos mediado por FcRn por otro lado, fueron objeto de investigación.

En primer lugar, se modificó Fab13.7 (Fd: SEQ ID 25, cadena ligera: SEQ ID 26) en el dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) como se describe (Choy et al. 2002). Brevemente, partes de la secuencia de aminoácidos de origen natural de la región bisagra de IgG1, incluido el primer residuo de cisteína, seguido de dos residuos de alanina, se añadieron en el extremo C terminal al dominio CH1 (...DKTHTCAA (SEQ ID 34), Fig. 20a, SEQ ID 27, cadena ligera véase Fab13.7, SEQ ID 26), dando como resultado Fab13.7'. So conjugó PEG_{40.000} con Fab13.7' utilizando TCEP 0,625 mM para reducir los enlaces disulfuro potencialmente formados del residuo de cisteína recién introducido (Fig. 20b). El Fab13.7_{PEG} así generado se unió a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana inmovilizada en ELISA con valores de CE₅₀ 2,6 veces mayores en comparación con Fab13.7 sin modificar (Fig. 20c, Tabla 12). Fab13.7_{PEG} no mostró una activación significativa de TNFR1 *in vitro*, como se determina en un ensayo de liberación de IL-8 usando células HT1080 (Fig. 20d). Bajo las mismas condiciones de ensayo, Fab13.7_{PEG} inhibió la liberación de IL-8 de las células HT1080, inducida por TNF 0,1 nM soluble, con un valor de CI₅₀ 4,9 veces mayor en comparación con Fab13.7. (Fig. 20e, Tabla 12). La modificación de Fab13.7 con PEG_{40.000} dio como resultado un perfil farmacocinético *in vivo* mejorado. En comparación con Fab13.7, la semivida inicial y terminal y el área bajo la curva aumentaron en factores de 3,8, 18,0 y 22,2, respectivamente (Fig. 20f, Tabla 12).

Tabla 12. Bioactividad de Variantes Fab13.7 monovalentes

Molécula	Unión ELISA CE ₅₀ [nM]	Inhibición de IL-8 CI ₅₀ [nM]	Semivida inicial [h]	Semivida terminal [h]	Área bajo la curva [%*h]
Fab13.7_{PEG}	5,0	98,2	0,92 ± 0,04	28,04 ± 6,76	1.008,03 ± 142,42
Fab13.7-MSA	0,7	65,5	1,85 ± 0,31	6,71 ± 0,85	966,20 ± 13,97
IgG13.7_{medio}	0,8	63,3	0,89 ± 0,38	3,51 ± 0,32	205,03 ± 56,18
Fab13.7-fc_{kih}0DS	0,5	61,2	1,67 ± 0,51	13,88 ± 0,69	967,64 ± 101,82
Fv13.7-Fc_{kih}0SD	0,3	30,7	0,97 ± 0,23	16,38 ± 0,49	701,30 ± 119,62
*Valores variables detectados en diferentes experimentos individuales					

Ejemplo 6: Proteína de fusión Fab13.7 MSA

En otro enfoque, Fab13.7 se fusionó genéticamente con albúmina de suero de ratón (MSA), conectado por un conector de 12 aminoácidos (Fig. 21a, Fd-MSA: SEQ ID 28, cadena ligera véase Fab13.7, SEQ ID 26). El Fab13.7-MSA así generado mostró una única banda en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, correspondiente al peso molecular calculado de 114 kDa (Fig. 21b). En condiciones reductoras, se observaron dos bandas, que representan la cadena ligera disociada y el fragmento Fd, fusionado con el resto MSA. La cromatografía de exclusión por tamaño confirmó la integridad de la estructura de la proteína y la ausencia de fracciones de proteína agregadas u oligomerizadas (Fig. 20c). Fab13.7-MSA se unió a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana inmovilizada en ELISA con un valor de CE₅₀ 1,7 veces mayor en comparación con Fab13.7 no modificado (Fig. 21d, Tabla 12) y no mostró una activación significativa de TNFR1 *in vitro*, como se determina en un ensayo de liberación de IL-8 usando células HT1080 (Fig.

21e). En las mismas condiciones de ensayo, Fab13.7-MSA inhibió la liberación de IL-8 de las células HT1080, inducida por TNF 0,1 nM soluble, con un valor de CI_{50} 1,9 veces mayor en comparación con Fab13.7. (Fig. 21f, Tabla 12). La fusión de Fab13.7 a MSA dio lugar a un perfil farmacocinético *in vivo* mejorado. En comparación con Fab13.7, la semivida inicial y terminal, así como el área bajo la curva, aumentaron en factores de 7,8, 4,3 y 21,3, respectivamente (Fig. 21g, Tabla 12).

Ejemplo 7: Mitad de anticuerpo IgG-13.7

Para crear una molécula de IgG monovalente que contenga la proporción de Fab13.7 intacta y, además, el sitio de unión de FcRn que se encuentra en la transición CH2-CH3, se cambiaron las composiciones de aminoácidos de la región bisagra de IgG1 y la parte Fc para evitar dimerización de las cadenas pesadas (Fig. 22a, cadena pesada IgG13.7_{mitad}: SEQ ID 29, cadena ligera véase Fab13.7, SEQ ID 26). Brevemente, las dos cisteínas de la región bisagra se reemplazaron por serinas (C224S, C227S) para obstruir la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Se introdujeron cuatro mutaciones adicionales en el dominio CH3 (P393A, F403R, Y405R, K407D), con la intención de obstruir las interacciones homoméricas CH3-CH3 (véase también Gu et al. 2015, SEQ ID 29, cadena ligera véase Fab13.7, SEQ ID 26). La IgG13.7_{mitad} así generada mostró una sola banda en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, correspondiente al peso molecular calculado de 73 kDa (Fig. 22b). En condiciones reductoras, se observaron dos bandas, que representan la cadena pesada y la ligera. La cromatografía de exclusión por tamaño confirmó la integridad de la estructura de la proteína y la ausencia de fracciones de proteína agregadas u oligomerizadas (Fig. 21c). IgG13.7_{mitad} se unió a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana inmovilizada en ELISA con un valor de CE_{50} 1,9 veces mayor en comparación con Fab13.7 no modificado (Fig. 22d, Tabla 12) y no mostró una activación significativa de TNFR1 *in vitro*, como se determina en un ensayo de liberación de IL-8 usando células HT1080 (Fig. 22e). Bajo las mismas condiciones de ensayo, IgG13.7_{mitad} inhibió la liberación de IL-8 de las células HT1080, inducida por TNF 0,1 nM soluble, con un valor de CI_{50} 1,8 veces mayor en comparación con Fab13.7. (Fig. 22f, Tabla 12). La fusión de Fab13.7 a una parte Fc monomérica dio lugar a un perfil farmacocinético *in vivo* mejorado. En comparación con Fab13.7, la semivida inicial y terminal, así como el área bajo la curva de IgG13.7_{mitad} se incrementaron por factores de 3,7, 2,3 y 4,5, respectivamente (Fig. 22g, Tabla 12).

Ejemplo 8: Proteína de fusión monovalente Fab13.7-Fc

Para superar la mejora limitada de las propiedades farmacocinéticas en el caso de IgG13.7_{mitad}, Fd y la cadena ligera de Fab13.7 se fusionaron ambos a un resto de proteína que consistía en los dominios CH2 y CH3 silenciados con FcγR, que contenían mutaciones adicionales que fomentan la heterodimerización aplicando las modificaciones de "botones en ojales" (Fig. 23a, Merchant et al. 2013, Fd13.7-Fc_{agujero}: SEQ ID 30, LC13.7-Fc_{cojal}: SEQ ID 31). Brevemente, además de las mutaciones en CH1, la región bisagra y CH2, que se ha reportado que suprimen la unión a los receptores Fcγ (Armour et al. 1999, Richter et al. 2013, Shields et al. 2001, Zettlitz et al. 2010) y los cambios de cisteína a serina descritos anteriormente en la región bisagra, se introdujeron las mutaciones T366S, L368A y Y407V en el dominio CH3, conectado al fragmento Fd, mientras que un solo residuo de treonina del dominio CH3 unido a la cadena ligera Fab13.7 fue cambiado a triptófano (T366W). El Fab13.7-Fc_{kih}0DS así generado (Fab13.7 conectado a una parte Fc con heterodimerización dirigida por botones en ojales [kih] y sin enlaces disulfuro [0DS] en la región bisagra) mostró una sola banda en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, correspondiente al peso molecular calculado de 98 kDa para la proteína completa (Fig. 23b). En condiciones reductoras, se observaron dos bandas, que representan la cadena pesada y la ligera. La cromatografía de exclusión por tamaño confirmó la integridad de la estructura de la proteína y la ausencia de fracciones de proteína agregadas u oligomerizadas (Fig. 23c). Fab13.7-Fc_{kih}0DS se unió a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana inmovilizada en ELISA con una actividad similar en comparación con Fab13.7 no modificado (Fig. 23d, Tabla 12) y no mostró una activación significativa de TNFR1 *in vitro*, como se determina en un ensayo de liberación de IL-8 usando células HT1080 (Fig. 23e). Bajo las mismas condiciones de ensayo, Fab13.7-Fc_{kih}0DS inhibió la liberación de IL-8 de las células HT1080, inducida por TNF 0,1 nM soluble, con un valor de CI_{50} 2,3 veces mayor en comparación con Fab13.7. (Fig. 23f, Tabla 12). La fusión de Fab13.7 con una parte Fc heterodimérica dio lugar a un perfil farmacocinético *in vivo* mejorado. En comparación con Fab13.7, la semivida inicial y terminal, así como el área bajo la curva de Fab13.7-Fc_{kih}0DS aumentaron por factores de 7,0, 8,9 y 21,3, respectivamente (Fig. 23g, Tabla 12).

Ejemplo 9: Proteína de fusión Fv13.7-Fc monovalente

En otro formato, los dominios variables (VH, VL) de Fv13.7 se fusionaron por separado con la región bisagra de las cadenas Fc (VH-bisagra-Fc(botón), VL-bisagra-Fc(ojal)) como se describe para Fab13.7-Fc_{kih}0DS (Fig. 24a, VH13.7-Fc_{cojal}: SEQ ID 32, VL13.7-Fc_{botón}: SEQ ID 33). El Fv13.7-Fc_{kih}0DS así generado mostró una sola banda en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, lo que representa ambas cadenas polipeptídicas individuales, que tienen un peso molecular similar, lo que da como resultado un PM calculado de 98 kDa para la proteína completa (Fig. 24b). La cromatografía de exclusión por tamaño confirmó la integridad de la estructura de la proteína y la ausencia de fracciones de proteína agregadas u oligomerizadas (Fig. 24c). Fv13.7-Fc_{kih}0DS se unió a la proteína de fusión TNFR1-Fc humana inmovilizada en ELISA con una actividad ligeramente mayor en comparación con Fab13.7 no modificado (Fig. 24d, Tabla 12) y no mostró una activación significativa de TNFR1 *in vitro*, como se determina en un ensayo de liberación de IL-8 usando células HT1080 (Fig. 24e). Bajo las mismas condiciones de ensayo, Fv13.7-Fc_{kih}0DS inhibió la liberación de IL-8 de las células HT1080, inducida por TNF 0,1 nM soluble, con un valor de CI_{50} similar en comparación con Fab13.7. (Fig. 24f, Tabla 12). La fusión de Fv13.7 a una parte Fc heterodimérica dio lugar a un perfil

farmacocinético *in vivo* mejorado. En comparación con Fab13.7, la semivida inicial y terminal, así como el área bajo la curva de Fv13.7-Fc_κh0DS aumentaron por factores de 4,1, 10,5 y 15,4, respectivamente (Fig. 24g, Tabla 12).

Los presentes datos demuestran la potencia antagónica mejorada de Fab13.7 en comparación con ATROSAB y FabATR, que se origina a partir de una disociación considerablemente más lenta del complejo anticuerpo receptor. Como se observaron valores de CI₅₀ similares para ATROSAB y FabATR en ensayos de liberación de interleuquinas y citotoxicidad, la presencia de un solo sitio de unión al receptor en lugar de dos, no parece reducir la capacidad de inhibir la activación de TNFR1 mediada por TNF. Por el contrario, la ausencia de un segundo sitio de unión para TNFR1 humano eliminó la potencia agonista observada en el caso de IgG13.7. Además, no se detectó actividad agonista de Fab13.7 solo o en presencia de un suero de cabra policlonal específico para Fab humano, destinado a restaurar la bivalencia o la multivalencia mediante la reticulación mediada por anticuerpos. Esto posiblemente podría indicar un riesgo reducido de efectos secundarios relacionados con la inflamación en la situación *in vivo* incluso en el caso de una respuesta inmune antifármaco. Por último, debido al tamaño reducido y a la ausencia de reciclaje de fármacos mediado por FcRn, Fab13.7 exhibe un tiempo de circulación en la sangre bastante corto, en comparación con las moléculas de IgG completas. La implementación de estrategias de extensión de la semivida permitió superar esta desventaja y subrayó el potencial de Fab13.7 para modificarse con éxito para satisfacer las necesidades de circulación prolongada en el cuerpo humano con respecto a la aplicación clínica futura.

Ejemplo 10: Materiales y métodos específicos de ensayos estándar

Materiales

El anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (específico de Fc), los anticuerpos anti-IgG humana conjugado con HRP (molécula completa, específico de Fc, específico de Fab), respectivamente, se adquirieron en Sigma (Taufkirchen, Alemania). El anticuerpo conjugado con HRP dirigido a la etiqueta His de los anticuerpos scFv se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE. UU.). La línea celular de rhabdomyosarcoma humano Kym-1 se cultivó en medio RPMI 1640, FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM y las células HT1080wt y células HeLa se cultivaron en medio RPMI 1640, FCS al 5 %, L-glutamina 2 mM. Proteína de fusión TNFR2-Fc humana (Mohler et al. 1993, The Journal of Immunology 151. Jg., Nr. 3, S. 1548-1561). Los productos químicos se adquirieron en Roth (Karlsruhe, Alemania), mientras que las enzimas (clonación y PCR) y los reactivos suplementarios se adquirieron en ThermoFisher (Munich, Alemania). Cualquier fuente diferente de consumibles se indica claramente a continuación.

Expresión de las proteínas de fusión TNFR1-Fc

El ADN que codifica la región extracelular de TNFR1 humano (aa 29-211), TNFR1 de ratón (aa 30-212) y TNFR2 de ratón (aa 23-258) se produjo sintéticamente (Geneart, Regensburg, Alemania) utilizando la información de secuencia de UniProtKB (Swiss-Prot) entrada P19438 (TNFR1 humano (Homo sapiens)), P20333 (TNFR2 humano (Homo sapiens)) y P25119 (TNFR2 ratón (Mus musculus)), introduciendo sitios de restricción apropiados entre los dominios individuales y se clonaron en pSecTagL1-Fc (modificado de pSecTag-FcHis, (Müller et al. J. Immunol. Methods (2008) 339(1): 90-8)). Las células HEK293 se transfectaron con ADN de plásmido usando lipofectamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se seleccionaron los clones transfectados de manera estable en presencia de zeocina como se describe (Müller et al. J. Biol. Chem. (2007) 282(17):12650-60). Las células se expandieron en RPMI, FCS al 5 %, L-glutamina 2 mM hasta una confluencia del 90 %. Para la producción de proteínas, el medio se sustituyó por Opti-MEM I (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y el sobrenadante se recogió cada 3-4 días. Las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante del cultivo celular como se describe a continuación.

Expresión de fragmentos de anticuerpos scFv en el periplasma de *E. coli* TG1

Un cultivo inicial de *E. coli* TG1 que contenía el plásmido de expresión se incubó durante la noche en 20 ml de 2xTY (100 µg/ml de Ampicilina, glucosa al 1 %) a 37 °C. Al día siguiente, se inoculó 1 litro de 2xTY (100 µg/ml de Ampicilina, glucosa al 0,1 %) con 10 ml del cultivo de toda la noche y se incubó con agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO [600 nm] de 0,8 a 1,0. Posteriormente a la adición de 1 ml de IPTG (concentración final 1 mM), el cultivo se incubó a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas más. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 4.500 *g y el sedimento se resuspendió en PPB hasta un volumen final de 50 ml. Para liberar los fragmentos de anticuerpo del periplasma, se añadieron 0,25 ml de lisozima (10 mg/ml en ddH₂O) y la suspensión, seguido de incubación en hielo durante 30 minutos. Antes del siguiente paso de centrifugación (10.000 *g, 10 minutos, 4 °C), los esferoblastos remanentes se estabilizaron mediante la adición de 0,5 ml de MgSO₄ 1 M. El sobrenadante se dializó durante la noche a 4 °C frente a PBS. Los fragmentos de anticuerpos se purificaron de la solución dializada después de una etapa de centrifugación adicional (1.000 *g, 15 min, 4 °C) como se describe a continuación.

Expresión de IgG13.7 y Fab3.7 después de la transfección transitoria

Se cultivaron células HEK293 hasta que cinco botellas de 175 cm² alcanzaron un 70-90 % de confluencia. Primero, se mezclaron individualmente 100 µg del ADN del vector y 250 µl de Lipofectamina, cada uno con 7 ml de Opti-MEM y luego se mezclaron conjuntamente y se incubaron durante 30 minutos a RT. La mezcla de transfección se ajustó a un volumen de 25 ml utilizando Opti-MEM, el medio de cultivo de cada botella se reemplazó por 5 ml de la solución de transfección y las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4-6 horas. La producción se inició reemplazando

el medio de transfección por 50 ml de Opti-MEM, que se reemplazó cada dos días hasta que se recogió al menos un litro. Los sobrenadantes se esterilizaron por filtración y se purificaron como se describe a continuación.

Purificación de proteínas - Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado (IMAC)

- 5 Los sobrenadantes de cultivo de tejidos filtrados estériles o los extractos periplasmáticos dializados se incubaron con Ni-NTA (Agarosa Ni-NTA, 64-17-5, Macherey-Nagel, Dueren, Alemania) rotando a 4 °C durante la noche. Para recoger la resina de purificación, las perlas que contenían sobrenadantes se cargaron en una columna de cromatografía Poly-Prep® por flujo por gravedad o presión de vacío moderada. El lavado se realizó usando tampón IMAC que contenía imidazol 20 mM hasta que casi no se pudo detectar proteína en el flujo que pasaba mediante una prueba de Bradford concomitante (90 µl de reactivo de Bradford (500-0006, BIO-RAD, Munich, Alemania) + 10 µl de muestra mezclada en una placa de microtitulación de 96 pocillos). Se eluyó la proteína de la resina con imidazol 250 mM en tampón IMAC y se recogieron fracciones de 500 µl. Las fracciones que contenían proteína (determinadas por la prueba rápida de Bradford como se describe) se agruparon y dializaron frente a PBS.

Purificación de proteínas - Cromatografía de Afinidad de Anticuerpos y Proteína A

- 15 El procedimiento se realizó exactamente como se describe para IMAC, usando resinas TOYOPEARL® AFRProtein A-650F (resina de proteína A, 22805, Tosoh, Stuttgart, Alemania) o HiTrap KappaSelect (fragmentos de anticuerpo selectivo de cadena kappa conjugados con una matriz de agarosa, 17-5458-12, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB). El lavado se realizó usando PBS y las proteínas se eluyeron de la resina con glicina 100 mM a pH 2-3. Las fracciones eluidas se agruparon directamente y se dializaron inmediatamente frente a PBS.

Cromatografía de Exclusión por Tamaño Preparativa

- 20 En el caso de proteínas ensambladas agregadas o multiméricas en las preparaciones, se realizó una etapa adicional de exclusión por tamaño utilizando el purificador Äkta. Las proteínas se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL a un caudal de 0,5 ml/min utilizando PBS como fase líquida. Se recogieron fracciones de 200 µl y las muestras que contenían el pico se agruparon para experimentos adicionales.

Caracterización de proteínas - Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

- 25 La SDS-PAGE se realizó estrictamente de acuerdo con Laemmli 1970, utilizando 3 µg de preparaciones de proteínas y los porcentajes indicados de gel concentrador y de separación.

Caracterización de proteínas - Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)

- 30 Para determinar el radio hidrodinámico, se analizaron muestras de proteína purificada de 30 µg usando HPLC Waters 2695 en combinación con una columna Phenomenex Yarra SEC-2000 (300 × 7,8 mm, caudal de 0,5 ml/min). La fase móvil fue Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M, Na₂SO₄ 0,1 M, pH 6,7. Se utilizaron las siguientes proteínas estándar: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), péptido FLAG (1 kDa).

Caracterización de proteínas - Estabilidad Térmica por Dispersión de Luz Dinámica

- 35 La estabilidad a temperaturas crecientes se midió mediante dispersión de luz dinámica usando el ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Herrenberg, Alemania). Se ajustaron alrededor de 100 µg de las muestras de proteína purificada a un volumen total de 1 ml mediante el uso de PBS y se aplicaron a una cubeta de cuarzo. Se midieron los recuentos de kilos por segundo (kcps), que indican el tamaño de las partículas de proteína desnaturizadas en la solución, que aumenta a medida que la proteína se agrega al calentarse. La temperatura se aumentó por etapas de 35 °C a 80 °C (intervalos de 1 °C, equilibrado de 2 minutos antes de cada medición).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

- 40 Las placas de microtitulación se recubrieron con 100 µl de la proteína indicada (1 µg/ml en PBS, véase la Tabla 3.3) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Los sitios de unión residuales se bloquearon con MPBS al 2 % (leche desnatada en PBS, 200 µl por pocillo) a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se lavaron dos veces con PBS. Se incubaron 100 µl de las muestras diluidas en MPBS al 2 % a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la última etapa de incubación con 100 µl de los anticuerpos de detección conjugados con HRP en MPBS al 2 %.
- 45 En el caso de los experimentos de competición, ambas muestras de proteínas analizadas se prepararon individualmente (tituladas o diluidas a una sola concentración) y se mezclaron antes de aplicarlas a la placa. La proteína unida se detectó con 100 µl de solución de sustrato TMB, la reacción de HRP se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 1 M y se midió la absorción a la longitud de onda de 450 nm usando el lector de placas de microtitulación Infinite (TECAN, Maennedorf, Suiza). Entre cada etapa de incubación y antes de la detección, las placas se lavaron tres veces con PBST y dos veces con PBS.
- 50

Mediciones de Afinidad usando la Microbalanza de Cristal de Cuarzo

La dinámica de unión en tiempo real en las interacciones proteína-proteína se determinó mediante mediciones de

microbalanza de cristal de cuarzo (A-100 C-Fast o Cell-200 C-Fast, Attana, Estocolmo, Suecia). Uno de los compañeros de unión (ligando, p- ej., TNFR1-Fc) se inmovilizó químicamente en un chip sensor de carboxilo de acuerdo con el protocolo del fabricante a diferentes densidades (casi 200 Hz en el caso de condiciones de saturación para confirmar los resultados publicados previamente y 50-100 Hz, en particular a aproximadamente 50 Hz, para establecer condiciones de menor densidad de receptores, más parecidas a la situación en la superficie celular). Los experimentos de unión se realizaron con muestras (analito) diluidas en PBST (PBS, Tween 20 al 0,1 %) a pH 7,4 con un caudal de 25 µl/min a 37 °C. El chip se regeneró con 25 µl de NaOH 5 mM o glicina 20 mM, pH 2,0. Cada tercera medición, se midió una inyección de tampón de operación que se sustrajo de la curva de unión. Los datos se recogieron utilizando el software proporcionado por Attana para el dispositivo en particular y se analizaron mediante el software Attaché Office Evaluation (Attana, Estocolmo, Suecia) y TraceDrawe (ridgview instruments, Vange, Suecia).

Ensayo de Citotoxicidad en Kym-1

Se sembraron células Kym-1 (1×10^4 por pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las proteínas se diluyeron en RPMI 1640 + FCS al 10 %. Si se usaron dos especies de proteínas juntas en experimentos de competición, ambas muestras se prepararon individualmente (tituladas o diluidas a una sola concentración) y se mezclaron antes de aplicarlas a la placa. Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas antes de desechar el sobrenadante y se añadieron 50 µl de solución de cristal violeta a las células. Posteriormente, las placas se lavaron en ddH₂O 20 veces y se secaron. El tinte violeta remanente, resultante de las células vivas y adherentes, que se fijaron con el metanol contenido en la solución de tinción, se disolvió mediante la adición de 100 µl de metanol con agitación a RT durante 10 minutos. Las placas se midieron utilizando el lector de placas de microtitulación Infinite (Tecan, Maennedorf, Suiza).

Ensayo de Liberación de Interleuquinas

Se sembraron 2×10^4 células HeLa o HT1080 por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron en 100 µl de RPMI 1640 + FCS al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se intercambiaron los sobrenadantes para eliminar las citoquinas producidas constitutivamente. Las células se incubaron con series de dilución de muestras en RPMI 1640 + FCS al 5 % a 37 °C, CO₂ al 5 %. En el caso de los experimentos de competición, ambas muestras de proteínas analizadas se prepararon individualmente (tituladas o diluidas a una sola concentración) y se mezclaron antes de aplicarlas a la placa. Las células no estimuladas sirvieron como control. Después de 16-20 horas, las placas se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y los sobrenadantes celulares se analizaron directamente por ELISA, que se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes se diluyeron en RPMI 1640 (sin FCS) y los anticuerpos se diluyeron en Reactivo Diluyente (BSA al 0,1 %, Tween 20 al 0,05 %, TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Las placas de microtitulación recubiertas se bloquearon usando BSA (albúmina de suero bovino) al 2% en PBS y se realizaron lavados, así como detección y medición como se describe anteriormente para ELISA. Los kits de ELISA en sándwich para la detección de IL-6 e IL-8 en el sobrenadante del cultivo celular se adquirieron en ImmunoTools, (Friesoythe, Alemania).

Farmacocinética

A ratones transgénicos C57BL/6J, que portaban el gen del dominio extracelular del TNFR-1 humano en el locus del gen de ratón particular (C57BL/6J-huTNFRSF1Aecdtm1UEG/izi), se les inyectaron por vía intravenosa 12 µg a 25 µg de las proteínas analizadas. Los C57BL/6J con un fondo genético inalterado sirvieron como control. Se recogieron muestras de sangre después de 3 min, 30 min, 1 h, 3 h y 6 h, así como después de 3 días y 7 días y se incubaron en hielo inmediatamente. El suero se separó por centrifugación (13.000 g, 4 °C, 10 minutos) y se almacenó a -20 °C. La proteína remanente en el suero se detectó mediante ELISA de unión como se describe anteriormente. Los datos se mostraron como porcentaje del valor de 3 min. Alternativamente, la señal de ELISA en el momento de la inyección se interpoló a partir de las curvas obtenidas y se fijó en la concentración in vivo inicial sobre la base de la dosis inyectada y el volumen sanguíneo promedio de los ratones, lo que dio como resultado las concentraciones indicadas en los puntos temporales de medición.

Presentación en Fagos - Clonación del Vector Aceptor pHENIS_scFvIG11-fsSTOP

La secuencia de ADN que codifica scFvIG11 se amplificó mediante PCR (descrita anteriormente) a partir del molde pHENIS-scFvL2a_huBR6_IG11 (Zettlitz 2010b) utilizando los cebadores NcoI_VHIZI06.1_back y BstZ171_fsSTOP_BssHII_for. El fragmento de ADN obtenido, que contenía un cambio de marco en combinación con un codón de parada, se insertó de nuevo en pHENISscFvL2a_huBR6_IG11 después de la digestión con NcoI y BstZ171, dando como resultado el vector aceptor pHENIS_scFvIG11-fsSTOP.

Presentación en Fagos - Generación de la Biblioteca de Selección EP03

La biblioteca de selección EP03 para la maduración por afinidad de scFvIG11, que dio lugar a scFvT12B, se generó mediante PCR propensa a errores utilizando el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph II (200550, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El molde de ADN pHENIS-scFvLib2a_huBR6_IG11 se amplificó mediante el uso de los cebadores LMB2 y fdSeq1. Con la intención de generar una incidencia moderada de mutaciones, se utilizaron 0,1 µg de ADN molde en una reacción de PCR de 30 ciclos. El producto de PCR resultante se clonó en el vector aceptor pHENIS_scFvIG11_fsSTOP después de la digestión con las

enzimas NcoI y NotI. La ligación se realizó durante la noche a 16 °C. Al día siguiente, el ADN ligado se precipitó mediante la adición de 1/10 del volumen de mezcla de ligación (LMV) de NaAc 3 M pH 5,2, 5 µl de glucógeno (20 µg/µl) y 2,7 LMV de etanol al 100 %. Después de 1 hora de incubación a -80 °C, el ADN se centrifugó (13.000 *g, RT, 5 minutos) y el precipitado secado al aire se resuspendió en 40 µl de ddH₂O y se congeló nuevamente a -20 °C en partes alícuotas de 2-4 µl.

3.18.3. Preparación de E. coli TG1 electrocompetente Transfiriendo 5 ml de un cultivo de una noche de E. coli TG1 crecido en medio SOB (que contiene glucosa al 1 %) a 500 ml de SOB fresco, se inoculó un cultivo y se hizo crecer hasta que se alcanzó una DO [600 nm] de 0,5 - 1,0. Posteriormente, las células se enfriaron en hielo durante al menos 15 minutos y se recogieron por centrifugación (2.000 *g, 4 °C, 15 min). El sedimento celular se resuspendió suavemente en 200 ml de ddH₂O enfriada con hielo (primero usando 20 ml, se añadieron otros 180 ml después de la resuspensión). El ciclo de centrifugación/resuspensión se repitió por segunda vez exactamente como se describe, luego las células resuspendidas se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron nuevamente (2.000 *g, 4 °C, 15 min). Las bacterias se resuspendieron en 50 ml de glicerol al 10 %, se incubaron en hielo durante otros 30 minutos y se recogieron nuevamente por centrifugación (1.500 *g, 4 °C, 15 min). El sedimento resultante se resuspendió hasta un volumen final de 500 a 1.000 µl, se mantuvo en hielo y se usó directamente para la electroporación.

Presentación en Fagos - Electroporación de E. coli TG1

Se prepararon E. coli TG1 electrocompetentes frescas (StrataGen, Kirkland, WA, EE. UU.) y se mezclaron 40 µl de la suspensión celular con una parte alícuota congelada de ADN ligado. Después de 1 minuto de incubación en hielo, la mezcla de ADN bacteriano se transfirió a una cubeta de electroporación (BIO-RAD, Múnich, Alemania) y se electroporó inmediatamente (17 kV/cm, 200 Ω, 25 µF, GenePulser® XCell, BIO-RAD, Múnich, Alemania). Posteriormente, las células transformadas se rescataron lavando la cubeta con 1 ml de LB, se transfirieron a un tubo de cultivo y se incubaron con agitación a 37 °C durante 1 hora, antes de sembrarlas en placas de agar LBamp. Para fines de control, se sembraron por separado 10 µl, 1 µl y 0,1 µl de una muestra transformada en placas de agar LBamp, así como 2,5 µl de muestras de electroporación que contenían 2 µl de ddH₂O o 1 µl de ADN pUC (0,1 ng/µl) mezclado con las células competentes.

Presentación en Fagos - Preparación de Fagos Auxiliares

Se utilizó E. coli TG de un cultivo de toda la noche, que se inició con bacterias recién sembradas en una placa mínima, para inocular un cultivo 2xTY de 500 ml (DO [600 nm] 0,05 - 0,07). A una DO [600 nm] de 0,4 a 0,5, se añadió 1 ml de fagos auxiliares VSC M13 (StrataGen, Kirkland, WA, EE. UU.) y el cultivo se incubó durante 30 minutos sin agitación a 37 °C y durante otros 30 minutos con agitación a 37 °C. Posteriormente, se añadió kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml y el cultivo se incubó con agitación a 30 °C durante la noche. Finalmente, las bacterias se separaron por centrifugación (4000 *g, 45 min, RT) y el sobrenadante que contenía el fago se almacenó a -20 °C en partes alícuotas de 1 ml.

Presentación en Fagos - Rescate y Precipitación de Fagos

Las bacterias transformadas se recogieron de placas de agar LB y se inocularon 50 ml de 2xTY (glucosa al 2 %, 100 µg/ml de ampicilina) a una DO inicial [500 nm] de 0,05 - 0,07. Cuando el cultivo alcanzó una DO [600 nm] de 0,4 - 0,5 después de la incubación con agitación a 37 °C, se añadió 1 ml de fagos auxiliares VSC M13 y el cultivo se incubó a 37 °C primero sin agitación (30 minutos) y luego con agitación (30 minutos). Posteriormente, las bacterias se recogieron por centrifugación (4.000 *g, RT, 15 min), se resuspendieron en 50 ml de 2xTY fresco que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 30 µg/ml de kanamicina y se incubaron, con agitación, a 30 °C durante la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron (4.000 *g, RT, 30 min) y se añadieron 10 ml de PEG6000 al 20 % a 40 ml del sobrenadante, se mezcló suavemente y se rotó a 4 °C durante 1 hora. Los fagos precipitados se disolvieron en 1 ml de PBS después de la centrifugación (4.000 *g, RT, 30 min) y se centrifugaron de nuevo a 13.000 *g y RT durante 10 min. El sobrenadante libre de bacterias, que contenía los fagos amplificados, se usó inmediatamente para la selección (o se almacenó a 4 °C para su uso posterior).

Presentación en Fagos - Selección de Inmunotubos

Los inmunotubos se recubrieron con TNFR1-Fc humano o TNFR2-Fc humano en concentraciones decrecientes con cada ronda de selección (Ronda 1: 1 y 0,1 µg/ml, ronda 2: 0,1 y 0,01 µg/ml, etc.; huTNFR2 siempre se recubrió usando 2 µg/ml). Los tubos se bloquearon con MPBS al 2 %. Se añadieron 1 o 10 µl de fagos precipitados a 1 ml de MPBS al 2 % y se incubaron en tubos recubiertos con TNFR2-Fc humano para eliminar los fagos con reactividad cruzada. Esta selección negativa se realizó exclusivamente antes de la primera ronda de selección. Después de 1 hora de incubación a RT, el sobrenadante se transfirió a inmunotubos recubiertos con TNFR1-Fc humano y se incubó durante una hora más. Comenzando en la ronda 2, se añadió TNFR1-Fc humano soluble al inmunotubo a una concentración final de 5 µg/ml para capturar fagos que se disociaban rápidamente y dificultar su unión a los receptores inmovilizados. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los tubos se lavaron 10 veces con PBST (Tween 20 al 0,1 %) y 10 veces con PBS. Los fagos se eluyeron con 1 ml de TEA 100 mM (triethylamina) tras la incubación durante 7 minutos. Los fagos eluidos se neutralizaron inmediatamente utilizando 500 µl de tampón TrisHCl 1 M (pH 7,5) y se añadieron a 8,5 ml de E. coli TG1 en fase logarítmica temprana. La incubación se realizó como se describe anteriormente para la transducción (37 °C, en reposo, 30 min; 37 °C, con agitación, 30 min). Las bacterias se separaron por centrifugación

(4.000 *g, RT, 10 min) y se sembraron en placas LBamp.

Presentación en Fagos - Biotinilación de Proteínas de Fusión Receptor-Fc

Se biotinilaron TNFR1-Fc humano y TNFR2-Fc humano mezclando muestras de proteínas con un exceso molar de 20 veces de Sulfo-NHS-SS-Biotina (Pierce, Rockford, EE. UU.) e incubación a RT durante 2 horas. El sulfo-NHS-SS-biotina libre remanente se eliminó de la muestra mediante diálisis frente a PBS a 4 °C durante la noche. La biotinilación exitosa de TNFR1-Fc y TNFR2-Fc se probó en ELISA de unión estándar a TNF inmovilizado. Las proteínas de fusión receptor-Fc unidas fueron detectadas por PolyHRP-Strep. El ELISA se realizó como se describe anteriormente.

Presentación en Fagos - Selección en equilibrio en Dynabeads Magnéticas

Para eliminar los fagos que se unen al TNFR2 humano o al resto Fc fusionado con reactividad cruzada, se añadieron 1 µl o 10 µl de fagos precipitados a 1 ml de MPBS al 2 %, que contenía TNFR2-Fc humano 0,1 µM y se incubó rodando a RT durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 50 µl de Dynabeads recubiertas con estreptavidina magnética a la mezcla de selección y se rodaron durante otros 5 minutos. Luego se separaron las perlas colocando el tubo de reacción de 2 ml en un dispositivo magnético (DYNAL® MPC®-S, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), la mezcla de selección se transfirió a un tubo de reacción nuevo de 2 ml y se añadió TNFR1-Fc humano a la mezcla de selección (Ronda 1: 10 nM/1 nM, ronda 2: 1 nM/0,1 nM, ronda 3: 0,1 nM/0,01 nM). Después de la incubación a RT (rotando durante 1 hora), se añadieron 10 µl de Dynabeads a la mezcla de selección y se incubaron y separaron como se describe para la ronda de selección negativa con TNFR2-Fc humano. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de DTT 10 mM (ditiotreitól) a las perlas para liberar los fagos unidos del antígeno. La transducción se realizó como se describe para la selección de inmunotubos.

Presentación en Fagos - ELISA para Fagos Policlonales

Los cambios en la unión total del conjunto de fagos se ensayaron mediante ELISA de fagos policlonales. El procedimiento experimental se describe en la sección ELISA, aquí se usó para el recubrimiento el antígeno que estaba sujeto a la selección de presentación en fagos. Se mezclaron 10 µl de fagos precipitados con 90 µl de MPBS al 2 %, se aplicaron a la placa de microtitulación y se detectaron los fagos unidos usando un anticuerpo anti-M13-HRP (27942101, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido).

Presentación en Fagos - Cribado de Selecciones de Presentación en Fagos

Se inocularon 100 µl de 2xTY LBamp por pocillo de 1 a 4 placas de microtitulación con clones individuales (100 a 400 colonias), que se recogieron de las placas después de la transducción de la ronda de selección final y se incubaron con agitación a 37 °C. Cuando el enturbiamiento era visible, se añadieron 25 µl de LB que contenía fagos auxiliares VCS M13 (1 ml por placa de microtitulación) y se incubaron para la transducción como se describe. Posteriormente, se añadieron a la placa de microtitulación 25 µl de LB que contenía 240 µg/ml de kanamicina (concentración final de 30 µg/ml) y la placa se incubó a 30 °C, agitando durante la noche. Al día siguiente, las bacterias se separaron por centrifugación (500 *g, RT, 5 min) y los sobrenadantes se mezclaron 1:1 con MPBS al 2 % y se analizaron por ELISA como se describe en el ELISA de fagos policlonales, ya sea en mediciones de un punto o titulados.

Presentación en Fagos - Cribado de la Tasa de Disociación de Sobrenadantes de Cultivos de Bacterias que Contienen Fagos

La constante de la tasa de disociación de los fagos portadores de scFv se determinó mediante cribado de la tasa de disociación, utilizando la tecnología QCM. El rescate de fagos se realizó de manera similar al protocolo descrito, sin embargo, se redujo la escala a un cultivo de LB de 5 ml. Se usaron 100 µl de un cultivo de toda la noche (o una preparación de scFv purificado) para la inoculación y se añadieron fagos auxiliares VSC M13 cuando los cultivos mostraron un enturbiamiento visible. Las siguientes etapas se llevaron a cabo como se mencionó anteriormente. Sin precipitación, los sobrenadantes que contenían fagos se diluyeron 1:2 en PBST (Tween 20 al 0,1 %) y se aplicaron a un chip sensor, inmovilizado con huTNFR1-Fc a una densidad moderada de (48 Hz). El tampón de operación también se mezcló 1:1 con LB para minimizar los efectos del tampón. El valor medio de tres mediciones se analizó utilizando el software de oficina Attaché (Attana, Estocolmo, Suecia).

Acoplamiento de Fab13.7 a Polietilenglicol

El Fab13.7 modificado con cisteína (Fab13.7') se acopló a metoxi-PEG40kDa2Maleimida (mPEG-Mal). El día anterior, las proteínas se redujeron añadiendo TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina, f.c. 5 mM) e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se eliminó el TCEP por diálisis en D-Tube™ Dializer Mini (punto de corte de MW 6 - 8 kDa) frente a tampón Nellis 1x saturado con nitrógeno (tampón Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 30 mM, pH 6,7) durante la noche a 4 °C usando un agitador magnético. Se mezcló Fab13.7' reducido con mPEG-Mal en una proporción molar de 1:10 (proteína:mPEG-Mal) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Para evitar la reoxidación de Fab13.7', la incubación se superpuso con nitrógeno. Finalmente, los grupos de maleimida libres y reactivos se apantallaron mediante la adición de L-cisteína (f.c. 100 µM) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

REFERENCIAS

- Abhinandan KR, Martin AC. Analyzing the "degree of humanness" of antibody sequences. *J Mol Biol.* 2007 369(3):852-62.
- 5 Richter F, Liebig T, Guenzi E, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kontermann RE. Antagonistic TNF receptor one-specific antibody (ATROSAB): receptor binding and in vitro bioactivity. *PLoS One.* 2013 8(8):e72156. doi: 10.1371/journal.pone.0072156. eCollection 2013.
- Zettlitz KA, Lorenz V, Landauer K, Munkel S, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kontermann R. ATROSAB, a humanized antagonistic anti-tumor necrosis factor receptor one-specific antibody. *MAbs.* 2010 2(6):639-47.
- 10 Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol.* 1999 ago;29(8):2613-24.
- Choy EH, Hazleman B, Smith M, Moss K, Lisi L, Scott DG, Patel J, Sopwith M, Isenberg DA. Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology (Oxford).* 2002 oct;41 (10):1 133-7.
- 15 Gu J, Yang J, Chang Q, Liu Z, Ghayur T, Gu J. Identification of Anti-EGFR and Anti-ErbB3 Dual Variable Domains Immunoglobulin (DVD-Ig) Proteins with Unique Activities. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0124135. Publicado en línea 2015 mayo 21. doi:10.1371/journal.pone.0124135
- 20 Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M, Huang A, Yang NY, Nishimura M, et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 agosto 6; 1 10(32): E2987-E2996. Publicado en línea 2013 julio 23. doi: 10.1073/pnas.1302725110
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIIL, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001 mar 2;276(9):6591 -604. Epub 2000 nov 28.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor del receptor huTNFR1 que es una construcción de anticuerpo humanizado que reconoce de forma monovalente huTNFR1 a través de un resto de unión a antígeno, en el que el resto de unión a antígeno comprende

- un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y

5 - un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias CDR CDRL1, CDRL2 y CDRL3;

en el que:

a) la secuencia de CDRH1 se identifica como SEQ ID 1;

b) la secuencia de CDRH2 se identifica como SEQ ID 10, en la que X en la posición 5 es S;

c) la secuencia de CDRH3 se identifica como SEQ ID 3;

10 d) la secuencia de CDRL1 se identifica como SEQ ID 4;

e) la secuencia de CDRL2 se identifica como SEQ ID 5; y

f) la secuencia de CDRL3 se identifica como SEQ ID 11, en la que X en la posición 3 es S o G;

y en el que

i) el VH comprende o consiste en la SEQ ID 13; y el VL comprende o consiste en la SEQ ID 19, o

15 ii) el VH comprende o consiste en la SEQ ID 13; y el VL comprende o consiste en la SEQ ID 17.

2. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que la construcción de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en moléculas Fab, moléculas scFv, Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), anticuerpos IgG1 mitad y dominios Fv.

3. El inhibidor de la reivindicación 1 o 2, en el que la construcción de anticuerpo se acopla a un polímero hidrofílico, tal como PEG, y/o se fusiona con un polipéptido, tal como albúmina sérica humana, transferrina, dominios o péptidos de unión a albúmina, dominios de unión a Ig, extensiones de polipéptido miméticas de PEG, un fragmento Fc de anticuerpo, un fragmento Fc de anticuerpo que porta mutaciones para permitir la heterodimerización preferida.

4. El inhibidor de la reivindicación 3, en el que la construcción de anticuerpo es cualquiera de los dominios Fab, scFv, dsFv o Fv, que se fusiona con un fragmento Fc de anticuerpo, en el que el Fc consiste en un heterodímero de dominios CH2 y CH3, en el que los dominios CH2 y/o CH3 portan una o más mutaciones puntuales que permiten la heterodimerización preferencial sobre la homodimerización.

5. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la construcción de anticuerpo está PEGilada, HESilada o PSAilada.

6. Una preparación farmacéutica que comprende el inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en la que la preparación se formula para uso parenteral, preferiblemente por administración intravenosa o subcutánea.

7. Un método para producir un inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que emplea un sistema de expresión de mamífero recombinante para expresar la construcción de anticuerpo, preferiblemente en el que se emplea una línea celular de producción de CHO.

8. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como medicamento.

35 9. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece de

a) inflamación aguda o crónica de las articulaciones, la piel y el intestino; y/o

40 b) enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad metabólica, síndrome de liberación de citoquinas, choque séptico, enfermedad neurodegenerativa aguda y crónica, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, colitis ulcerosa, pancreatitis, EPOC, infecciones virales o bacterianas fulminantes agudas, enfermedades neurodegenerativas crónicas, síndrome de fiebre periódica, querubismo y cáncer.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica el inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

45 11. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

12. Una célula huésped recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10 o el vector de expresión de la reivindicación 11.

13. El método de la reivindicación 7, en el que el sistema de expresión de mamífero recombinante emplea la célula huésped de la reivindicación 12.

Fig. 1

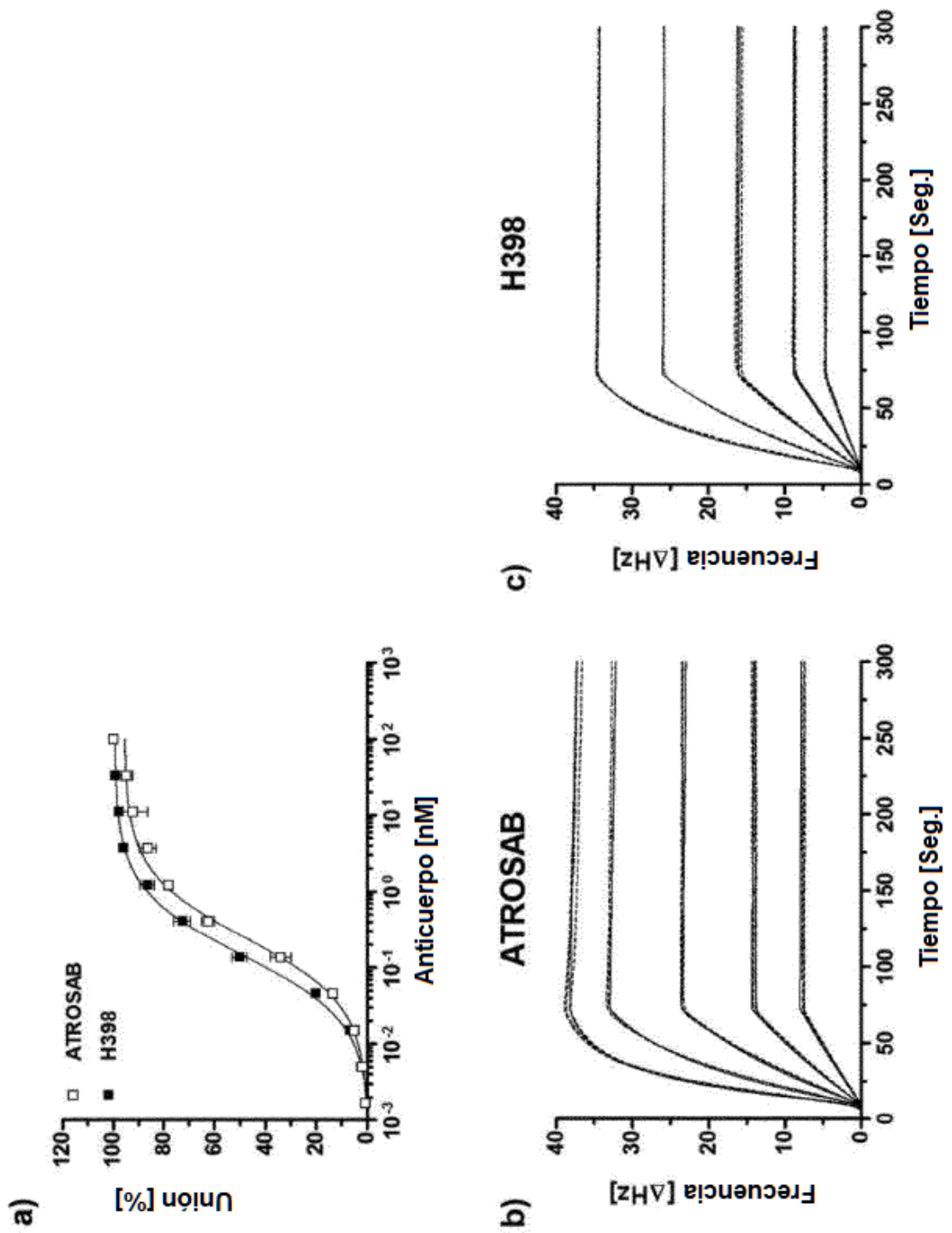


Fig. 2

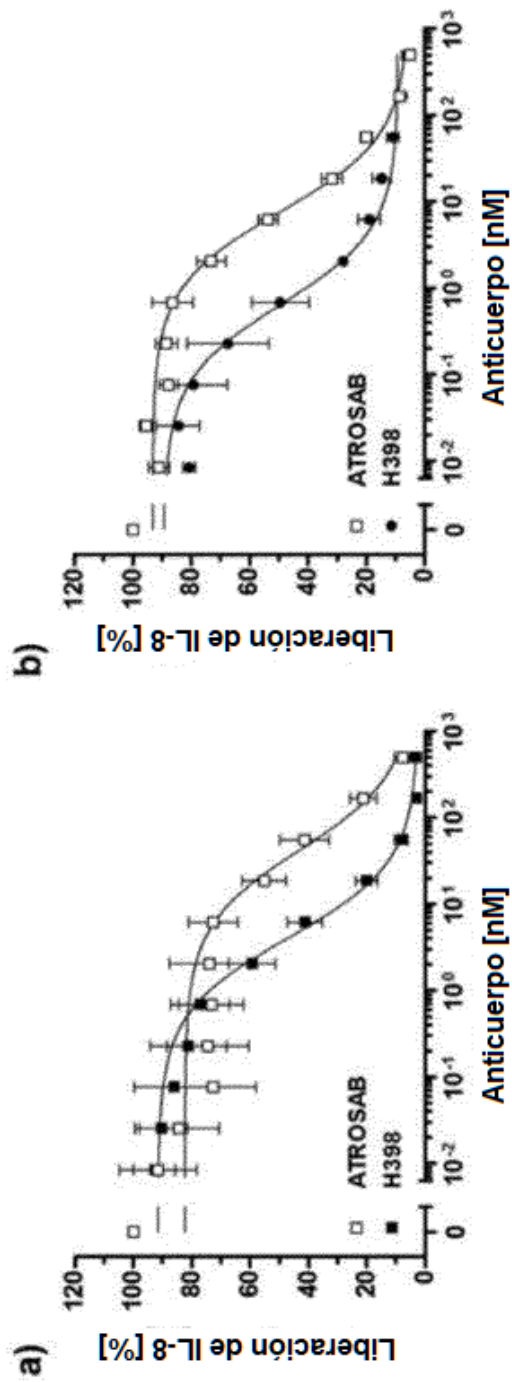


Fig. 3

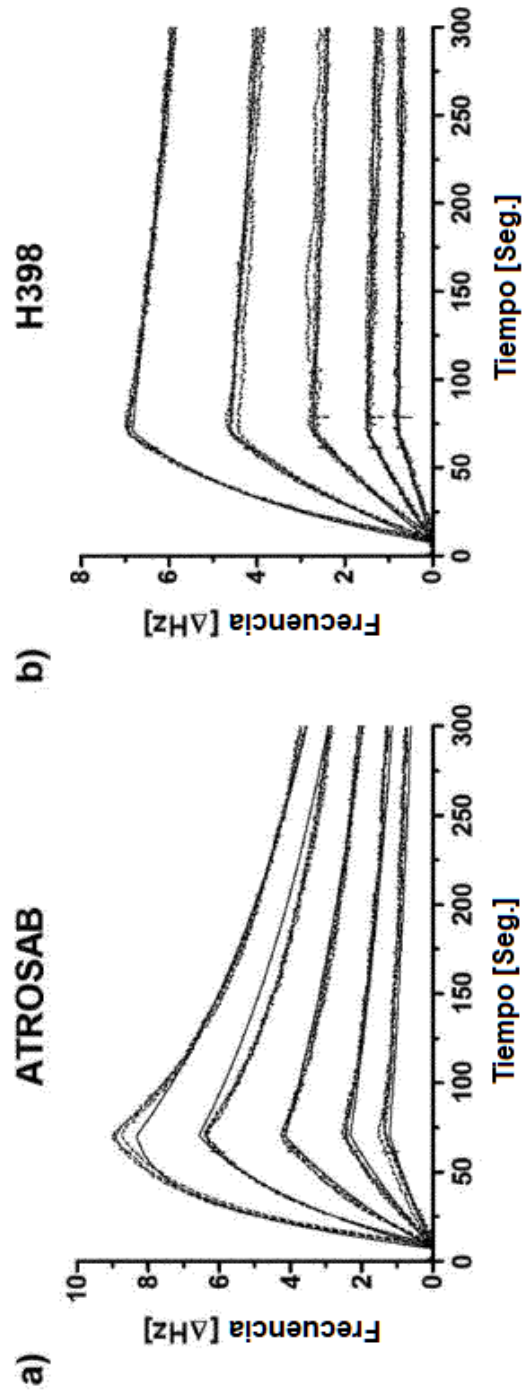


Fig. 4

a)

	FR1	CDRH1	FR2	CDRH2
Kabat	123456789102345678920234567893	02345	67894023456789	502a3456789602345
scFvIZI06.1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT	DFYIN	WVRQAPGQGLEWIG	EIYPYSGHAYYNEKFKA
scFvIG11				..V.TQ.E.K..D....
scFvT12B	H.....			..V.SQ.E.K..D....
scFvFRK13.7	H.....			..V.SQ.E.K..D....

	FR3	CDRH3	FR4
Kabat	67897023456789802abc345678990234	567891	003456789110
scFvIZI06.1	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	WDFLDY	WGQGTTVTVSS
scFvIG11			
scFvT12B			
scFvFRK13.7			

b)

	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2
Kabat	12345678910234567892023	4567abcde8930234	567894023456789	5023456
scFvIZI06.1	DIVMTQSPLESLPVTPGEPASISC	RSSQSLHLSNGNTYLH	WYLQKPGQSPQLLIY	TVSNRFS
scFvIG11				
scFvT12B				
scFvFRK13.7	.VQ.....S..SASV.DRVT.T.		..Q.....KA.K....	

	FR3	CDRL3	FR4
Kabat	78960234567897023456789802345678	990234567	89100345678
scFvIZI06.1	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	SQSTHVPYT	FGGGTKVEIKR
scFvIG11			
scFvT12B		..G.....	
scFvFRK13.7	...S.....T..SLQP..FAT...	..S.....	

Fig. 5

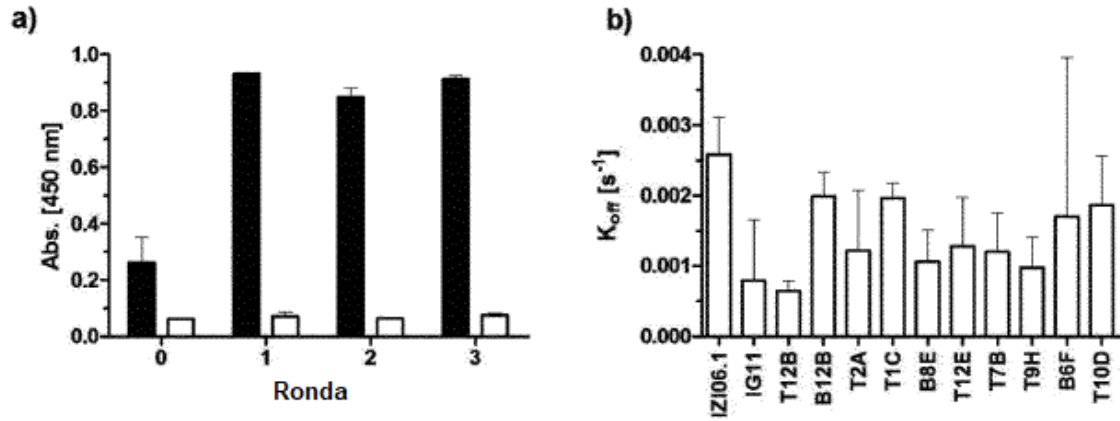


Fig. 6

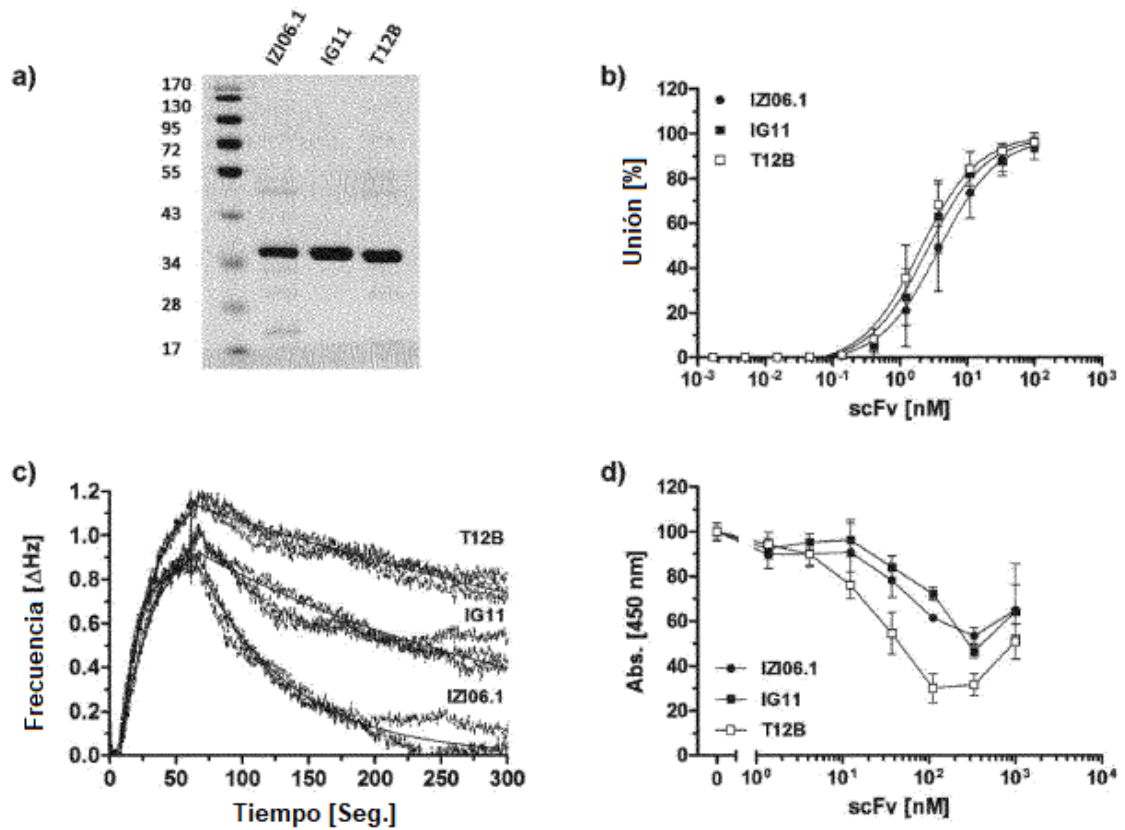


Fig. 7

a)

	FR1	CDRH1	FR2	CDRH2
Kabat	123456789102345678920234567893	02345	67894023456789	502a3456789602345
scFvIZI06.1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT	DFYIN	WVRQAPGQGLEWIG	EIYPYSGHAYYNEKFA
FRK13.1	E..GGLV...G.LRL..A...F..S		.I.....K....VS	G.....
FRK13.2	E..GGLV...G.LRL..A...F..S		.I.....K....VS	G.....

	FR3	CDRH3	FR4
Kabat	67897023456789802abc345678990234	567891	003456789110
scFvIZI06.1	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	WDFLDY	WGQGTITVTVSS
FRK13.1	.F..SR.NAKNSL.LQMN...A.....		
FRK13.2	.F..SA.NAKNSL.LQMN...A.....		

b)

	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2
Kabat	12345678910234567892023	4567abcde8930234	567894023456789	5023456
scFvIZI06.1	DIVMTQSPVSLPVPGEPAIS	RSSQSLLSNGNTYLH	WYLQKPGQSPQLLIY	TVSNRFS
FRK13.1	.IQ.....S..SASV.DRVT.T.		..Q....KA.K....	
FRK13.2	.VQ.....S..SASV.DRVT.T.		..Q....KA.K....	

	FR3	CDRL3	FR4
Kabat	78960234567897023456789802345678	990234567	89100345678
scFvIZI06.1	GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC	SQSTHVPYT	FGGCTKVEIKR
FRK13.1	...S.....T..SLQP..FAT...		
FRK13.2	...S.....T..SLQP..FAT...		

Fig. 8

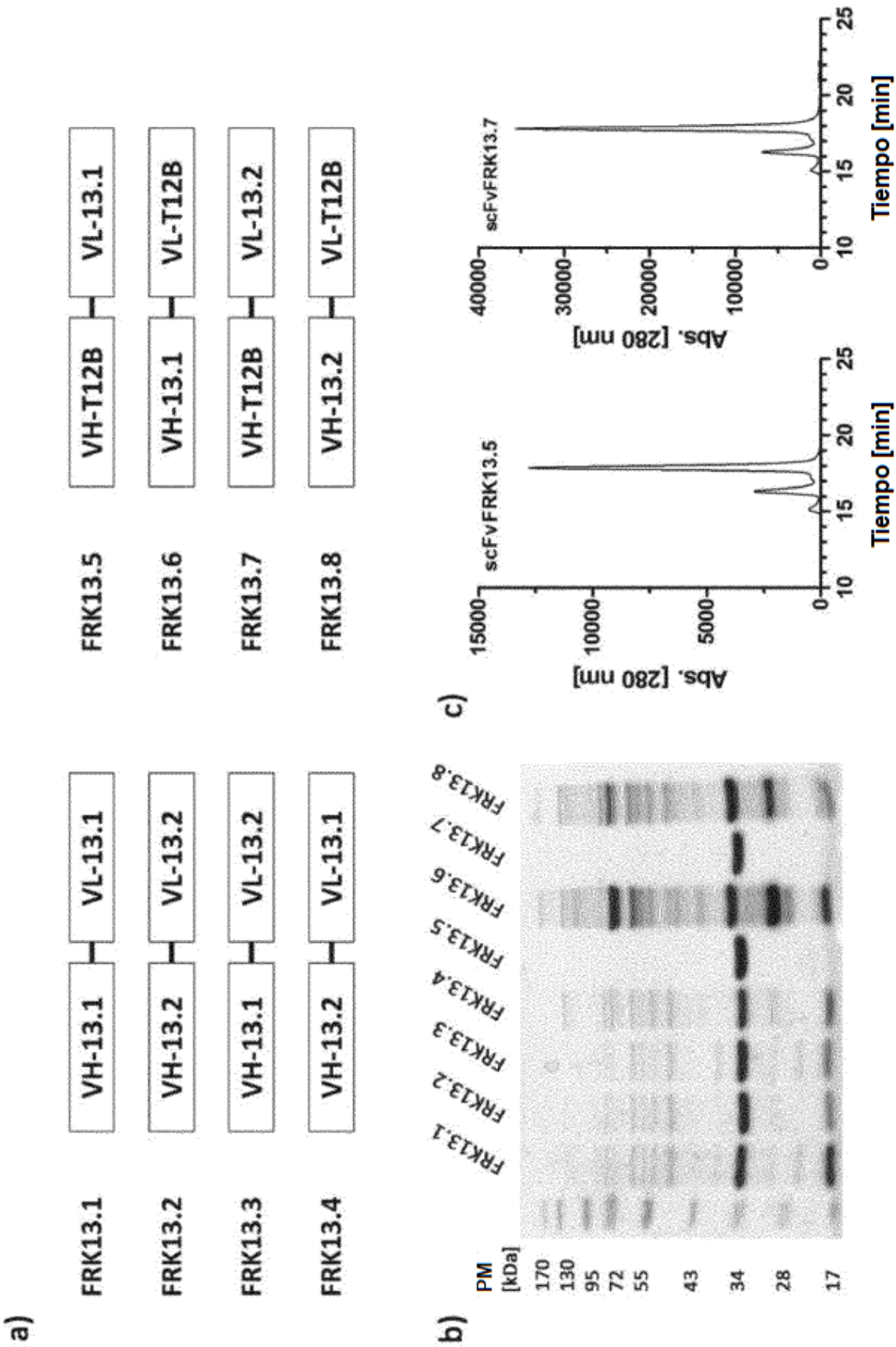


Fig. 9

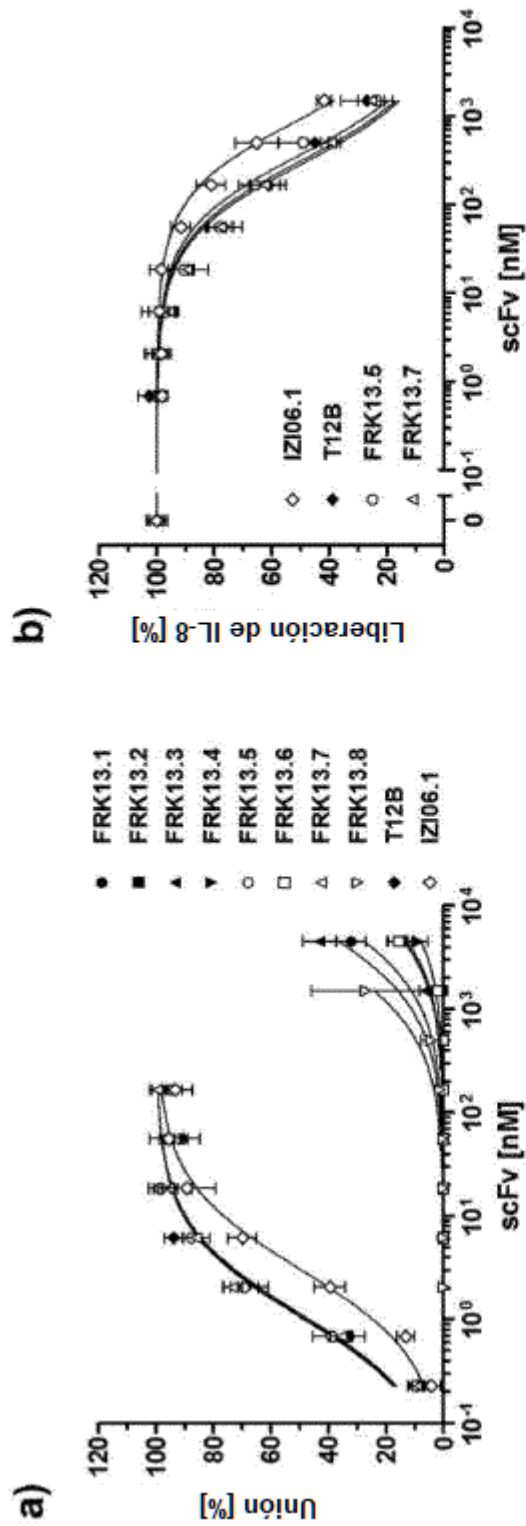


Fig. 10

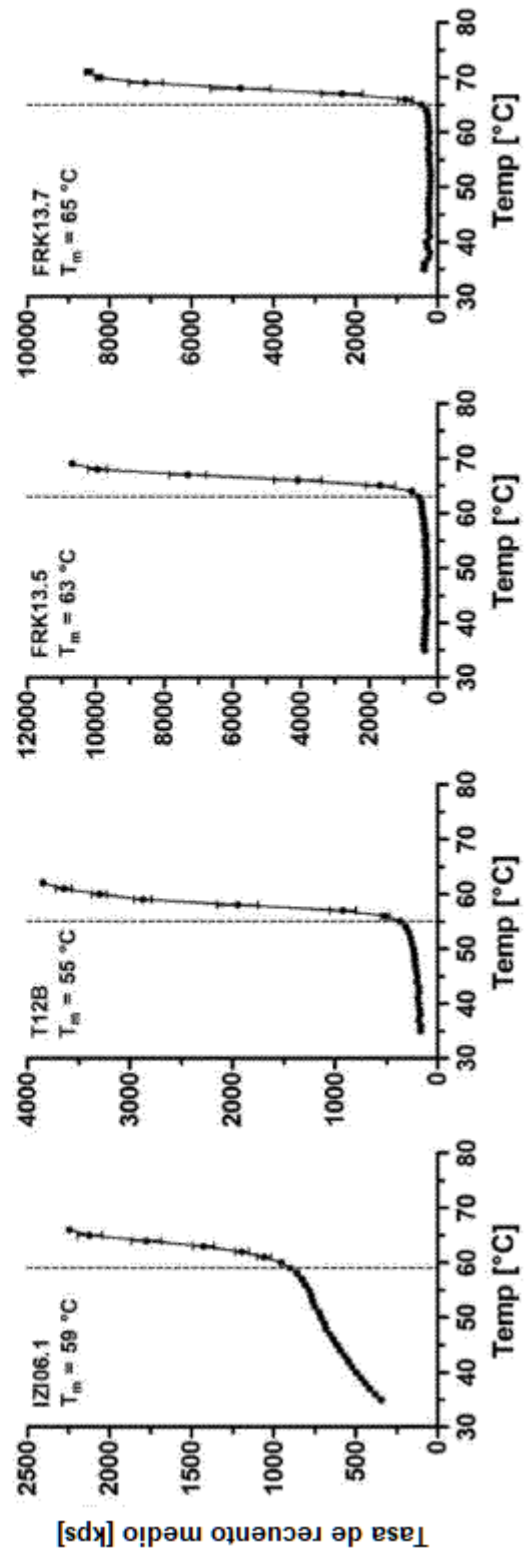


Fig. 11

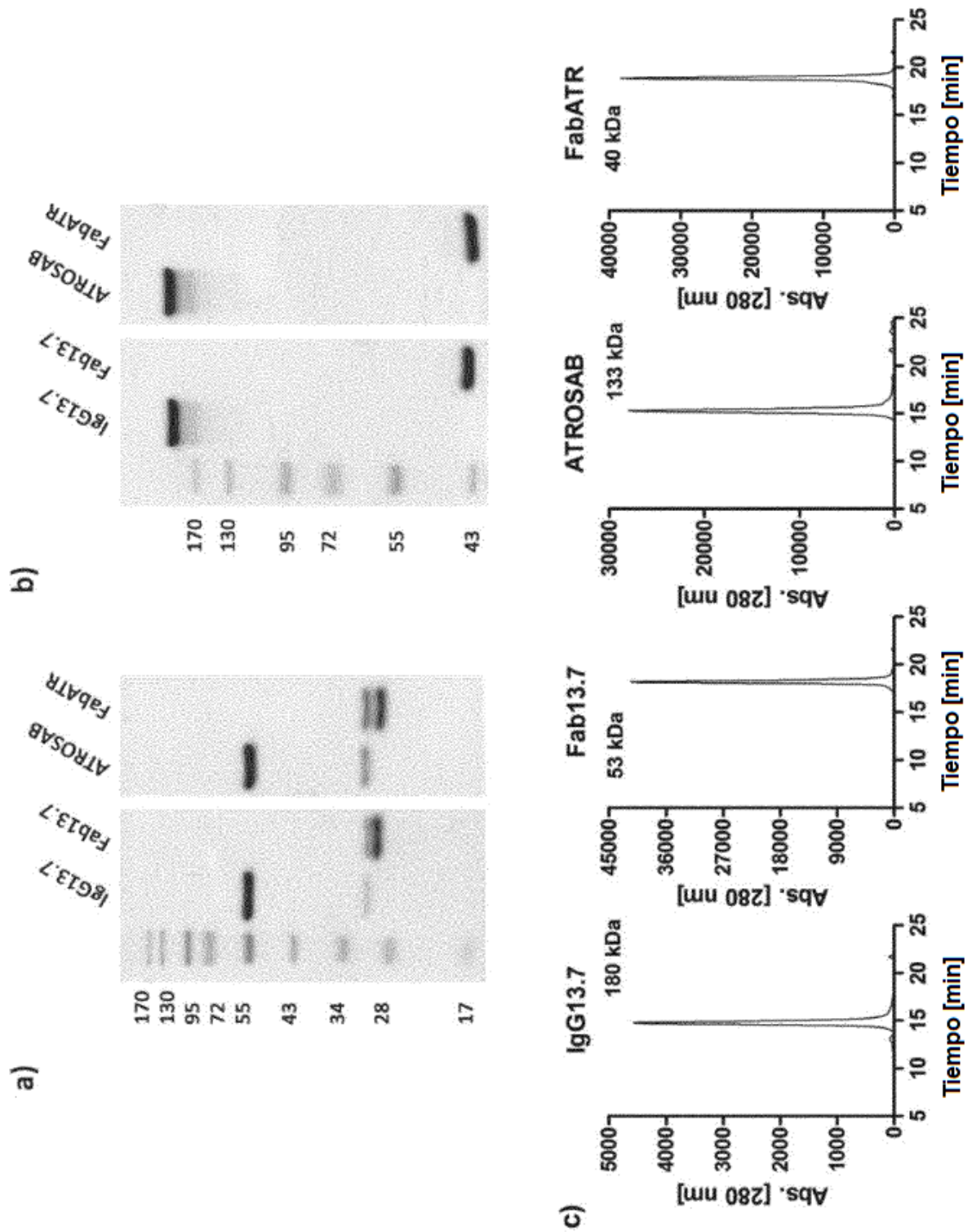


Fig. 12

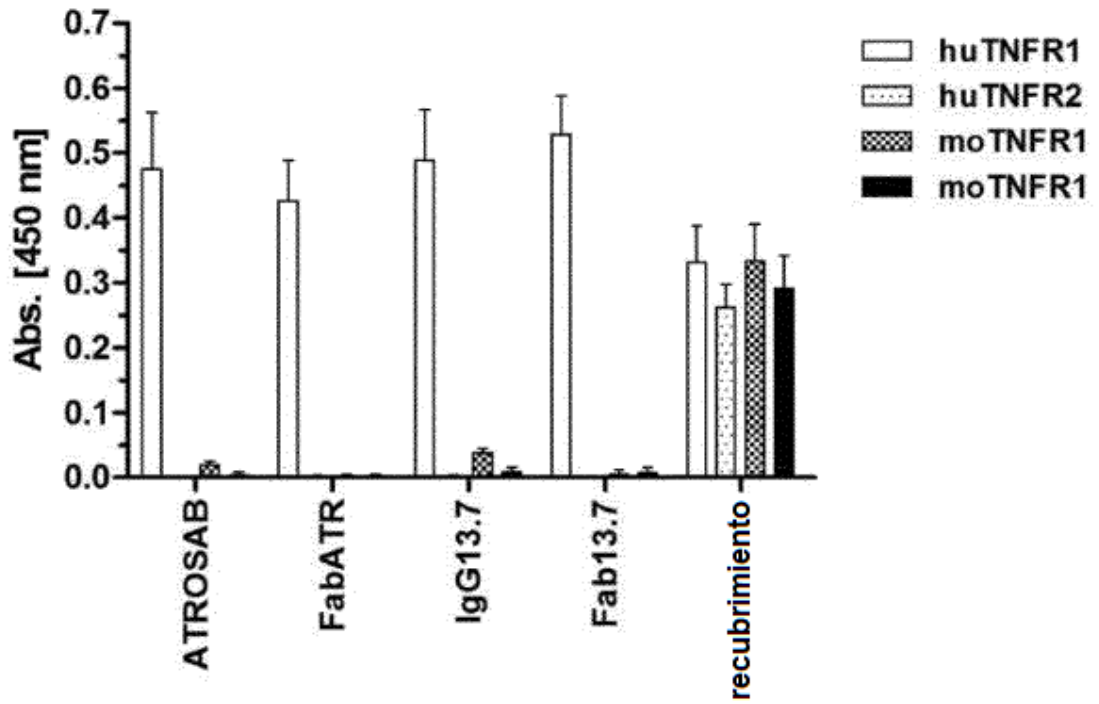


Fig. 13

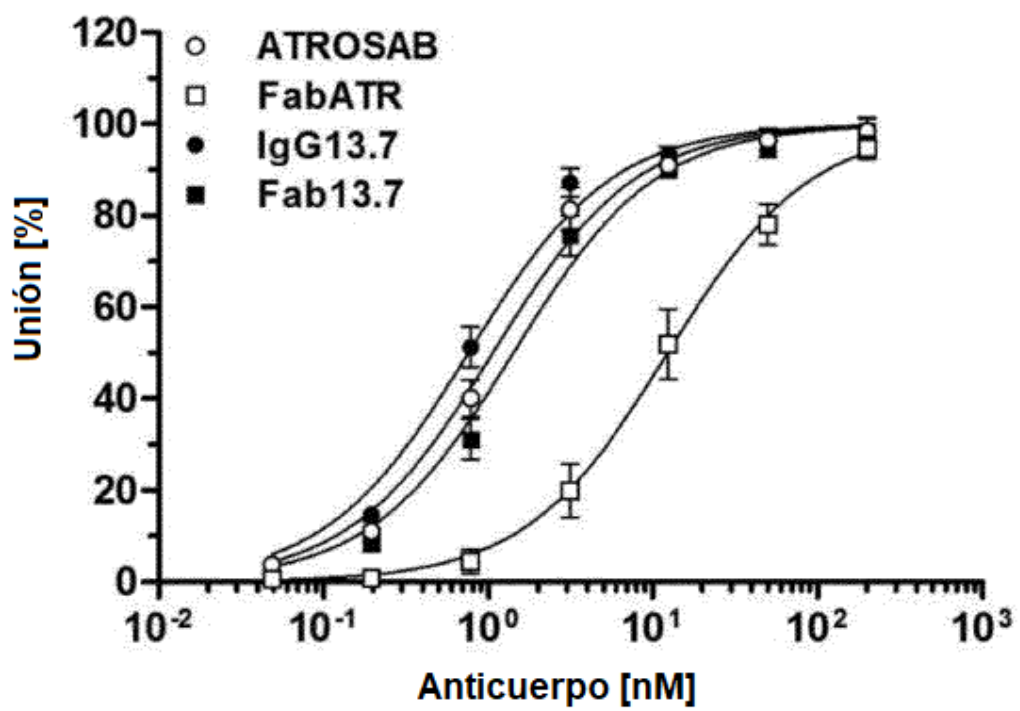


Fig. 14

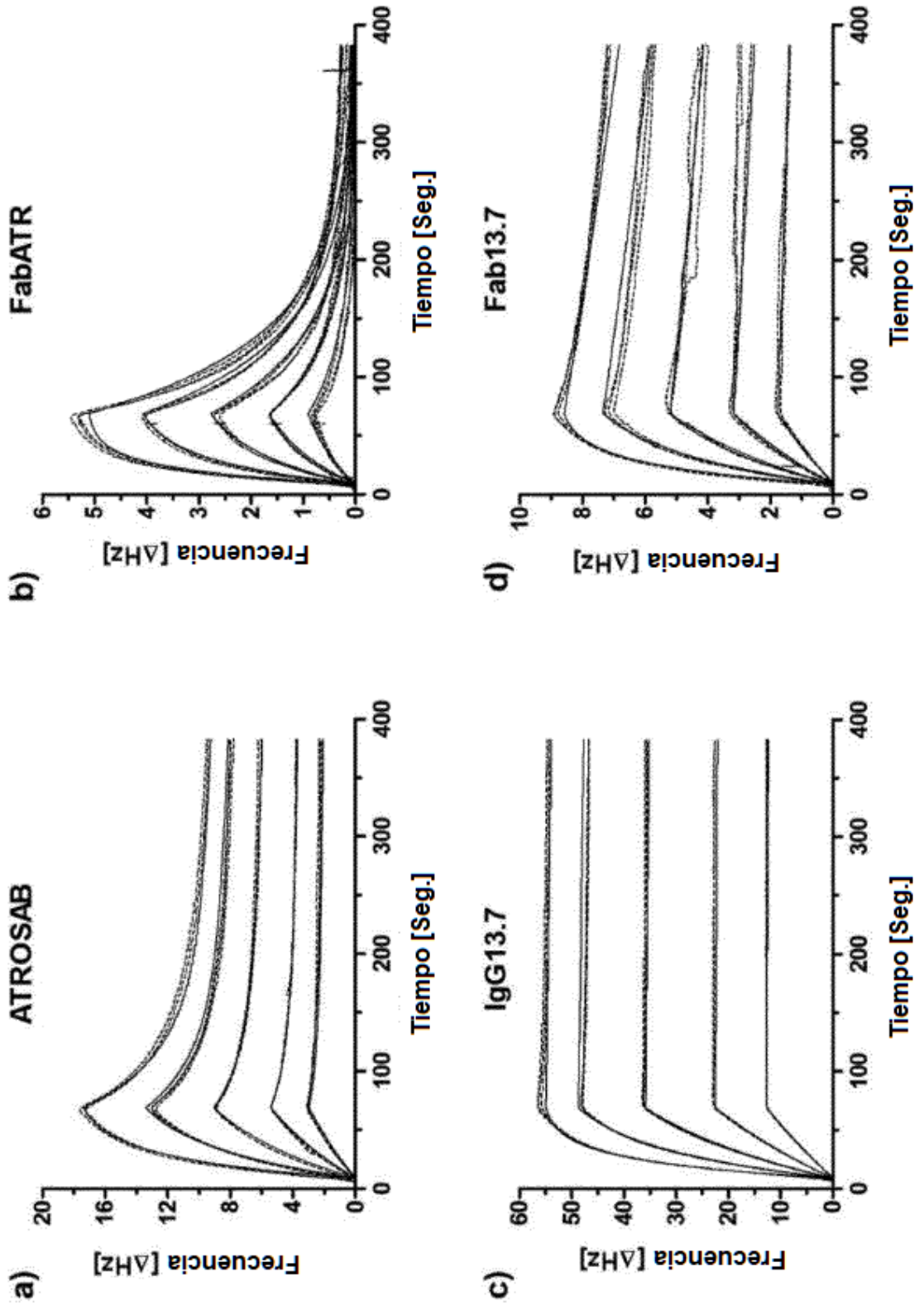


Fig. 15

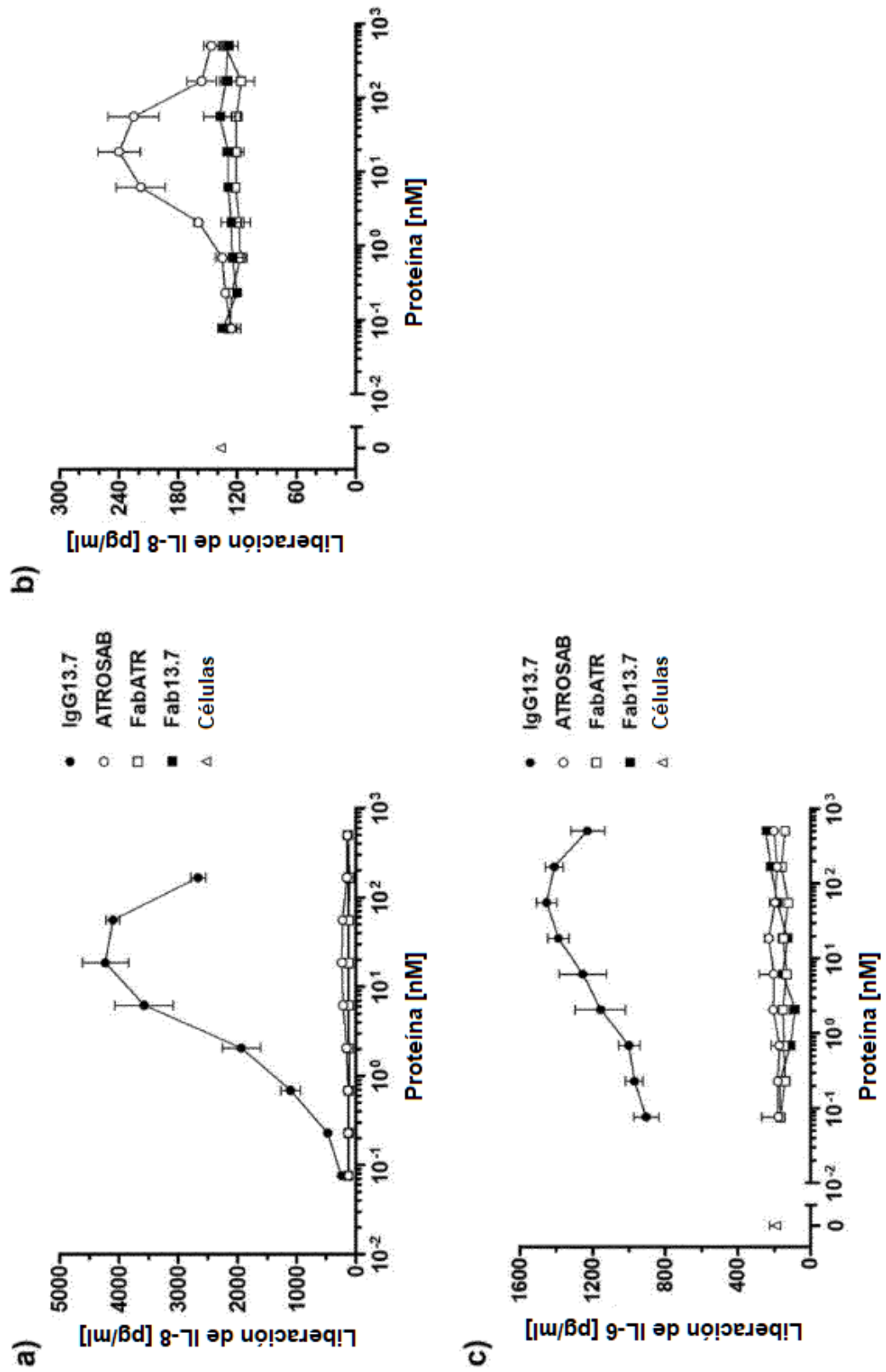


Fig. 16

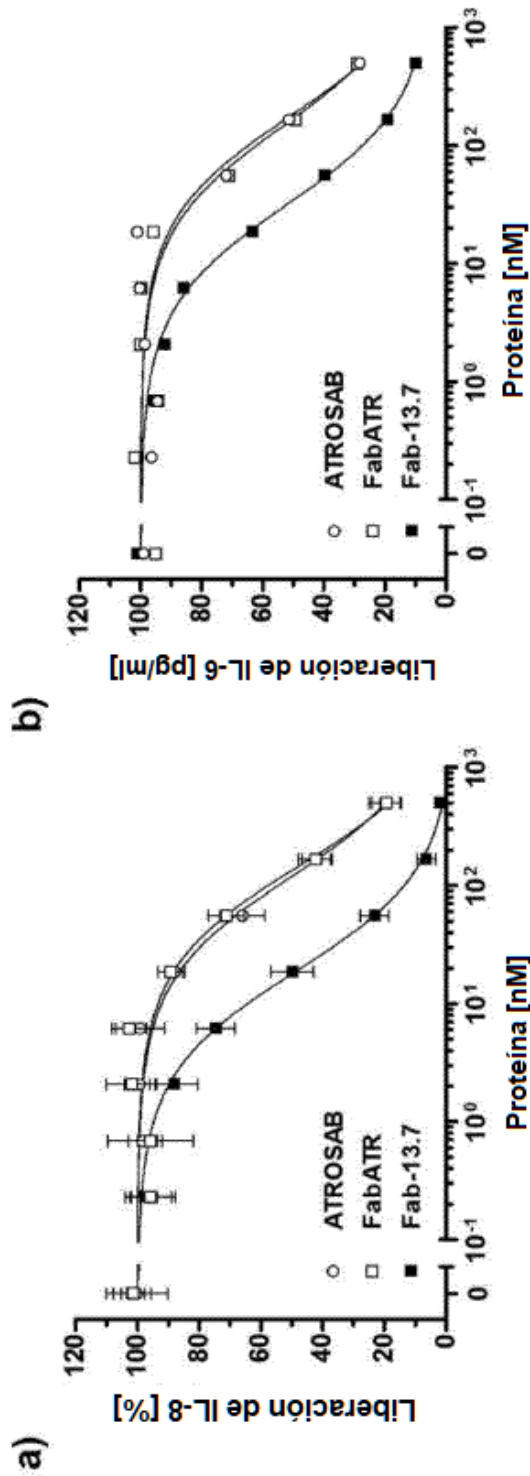


Fig. 17

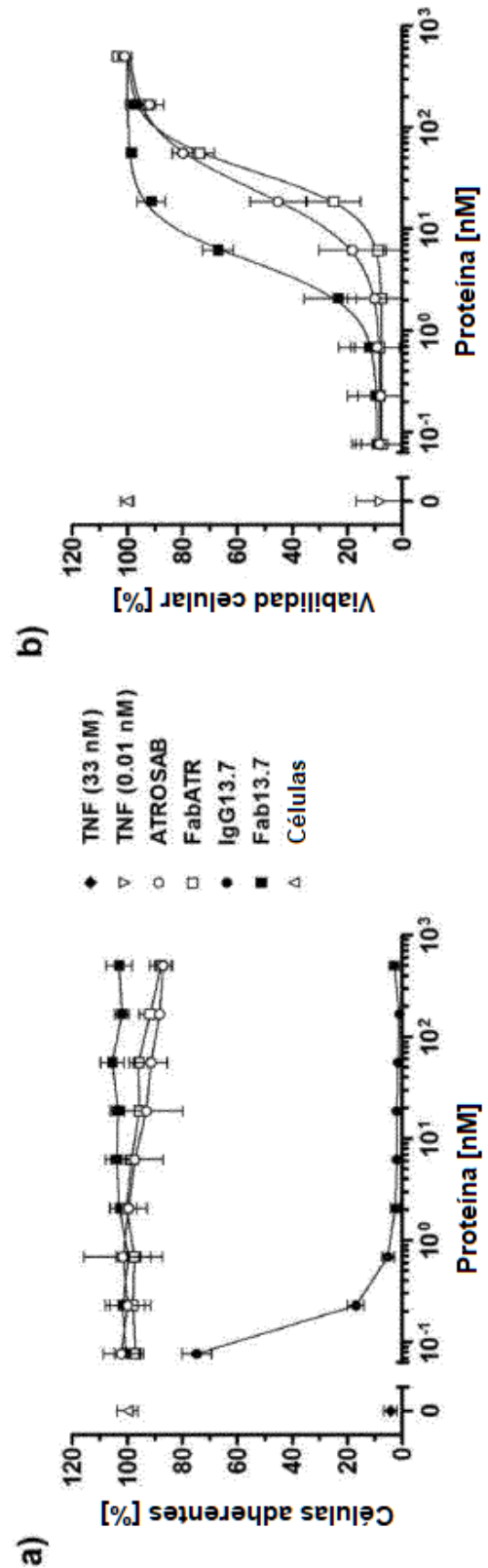


Fig. 18

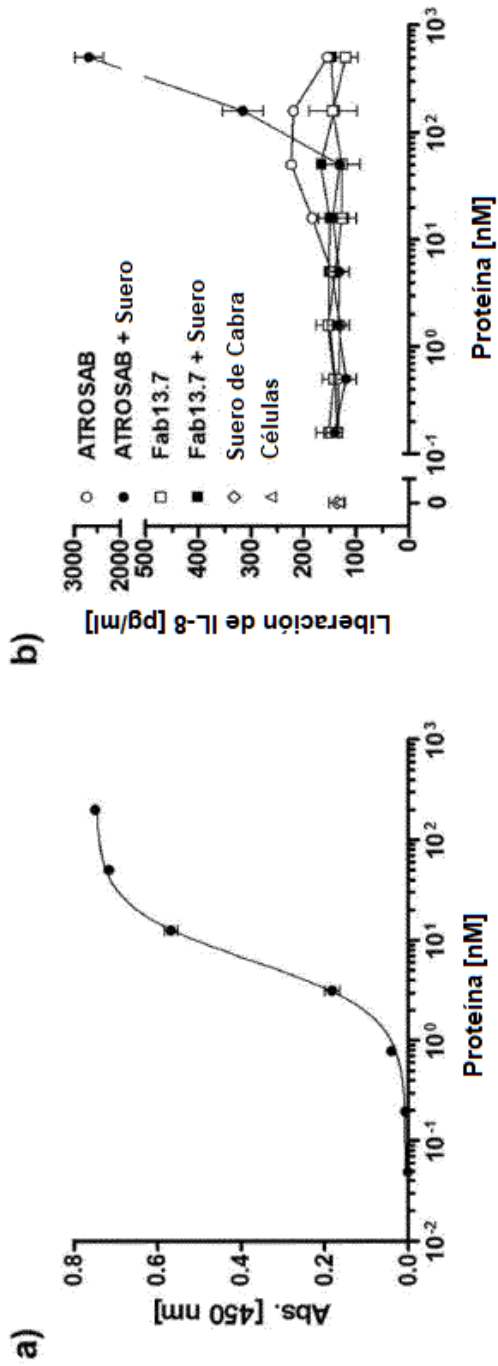


Fig. 19

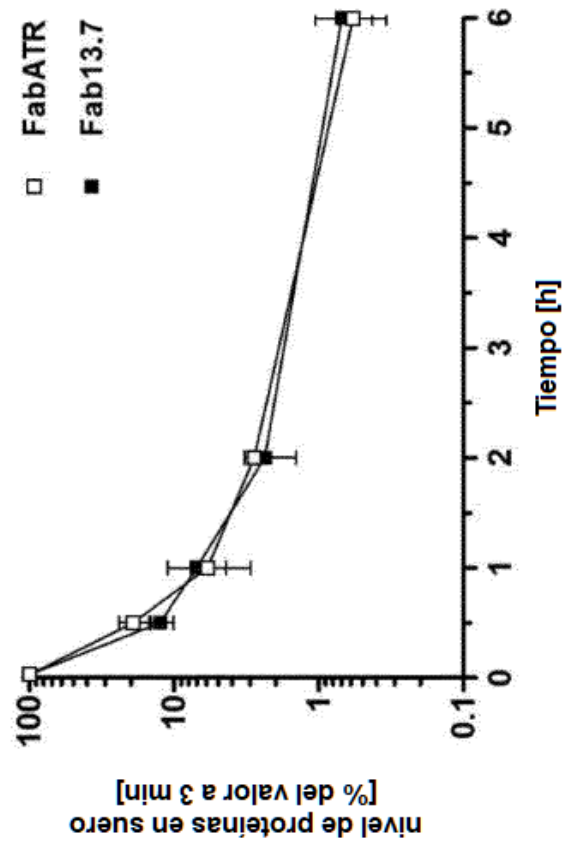
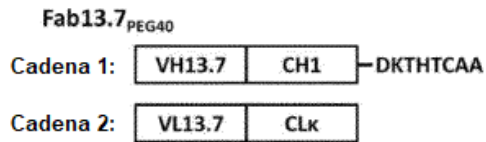
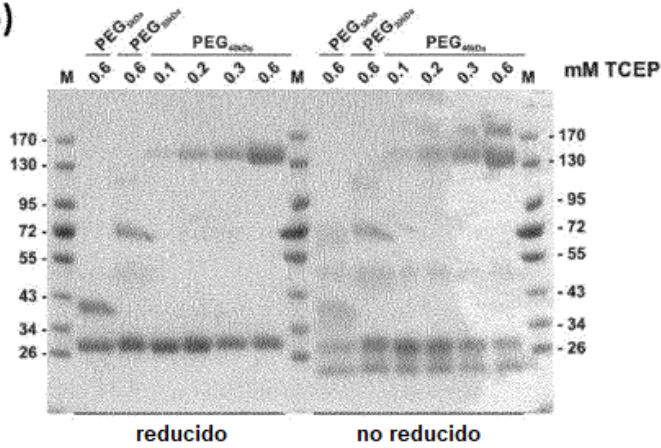


Fig. 20

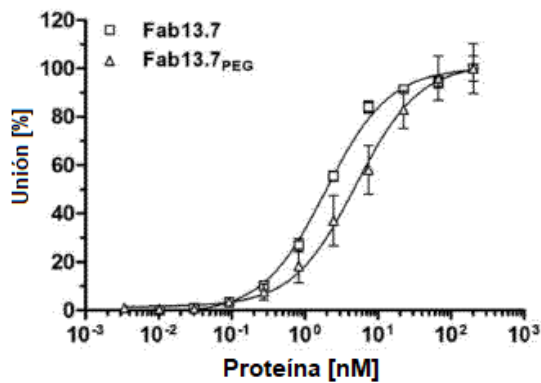
a)



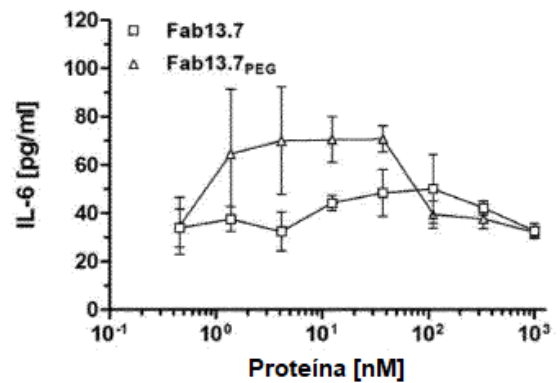
b)



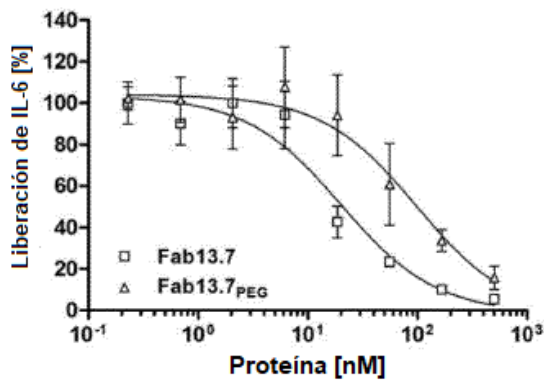
c)



d)



e)



f)

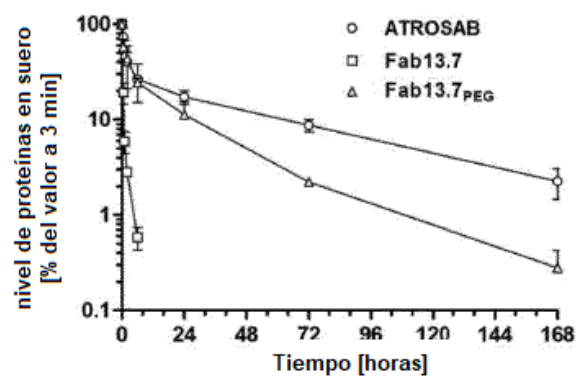
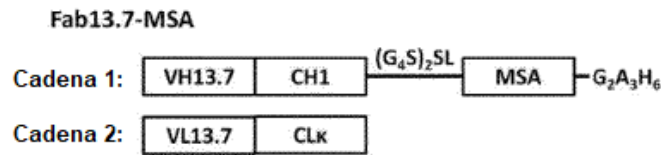
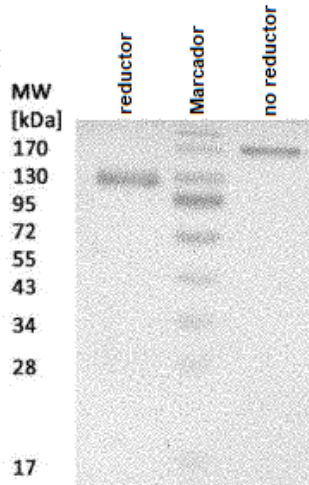


Fig. 21

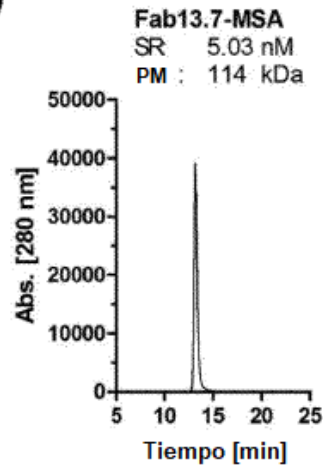
a)



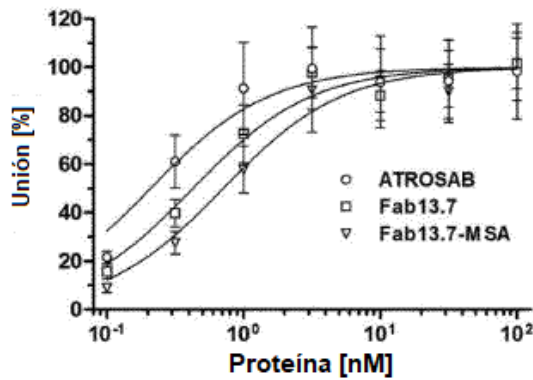
b)



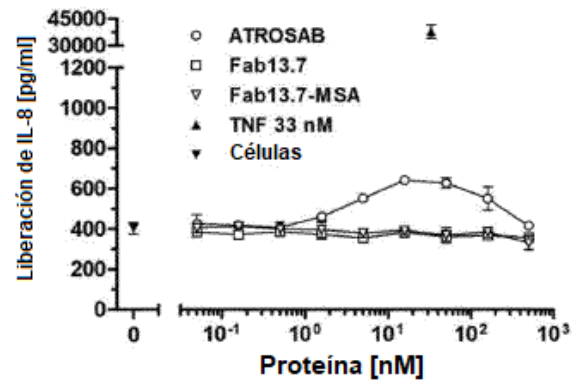
c)



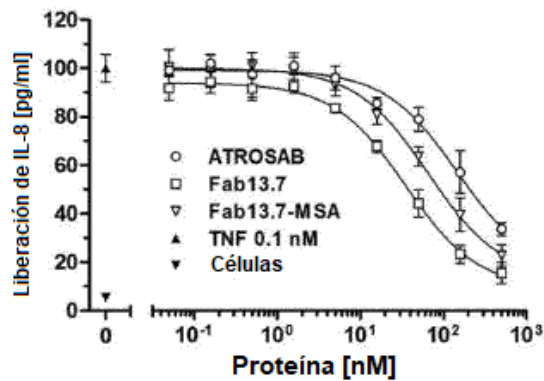
d)



e)



f)



g)

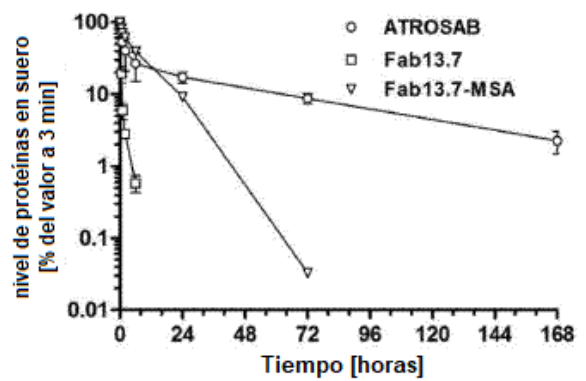
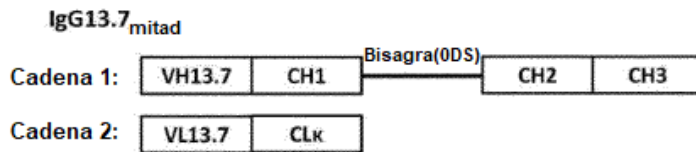
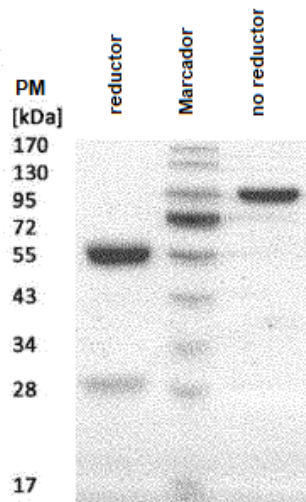


Fig. 22

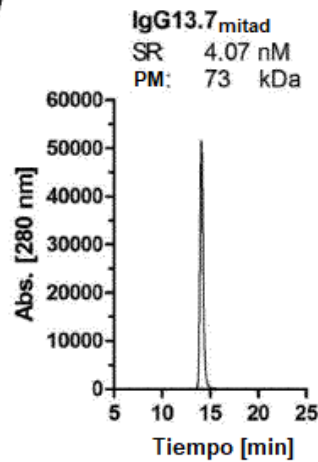
a)



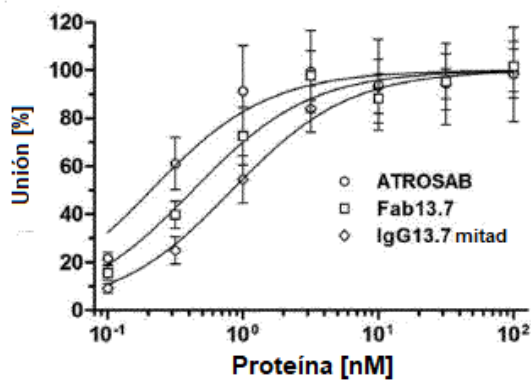
b)



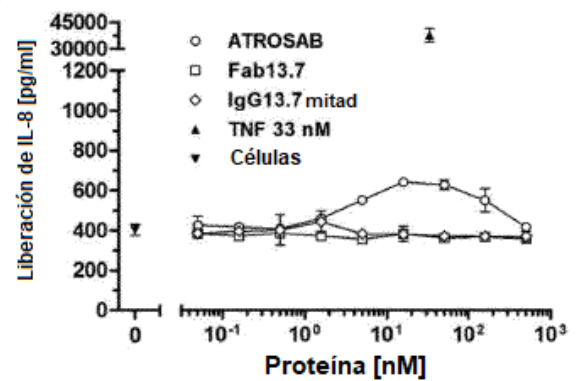
c)



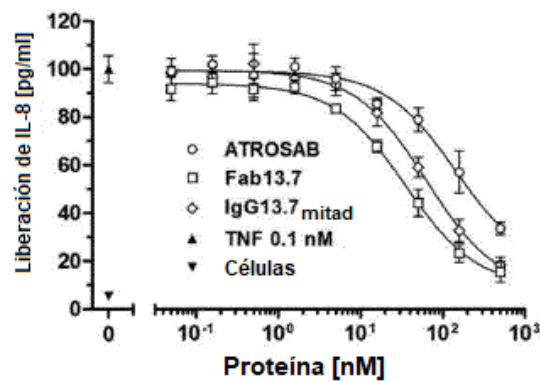
d)



e)



f)



g)

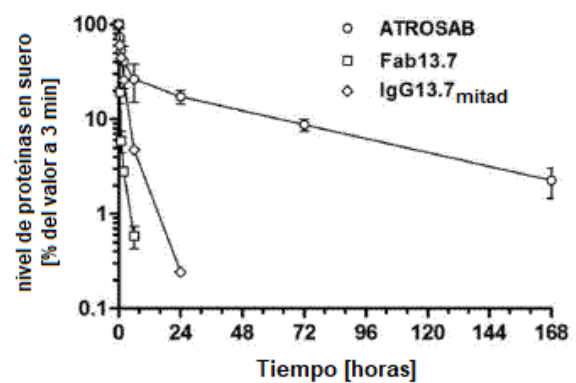
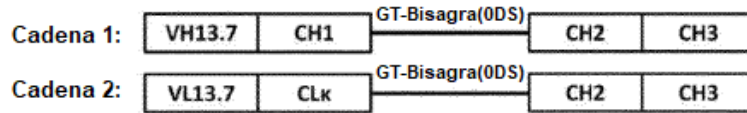


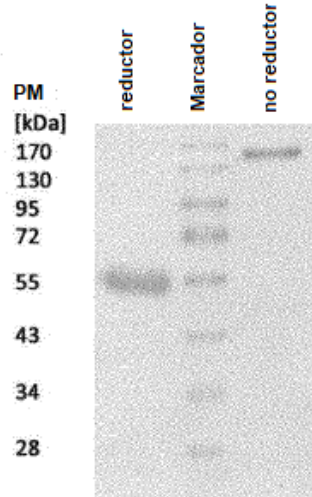
Fig. 23

a)

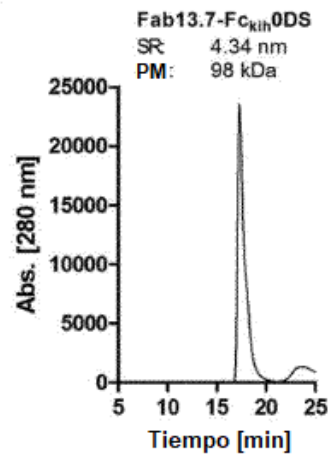
Fab13.7-Fc_{kih}0DS



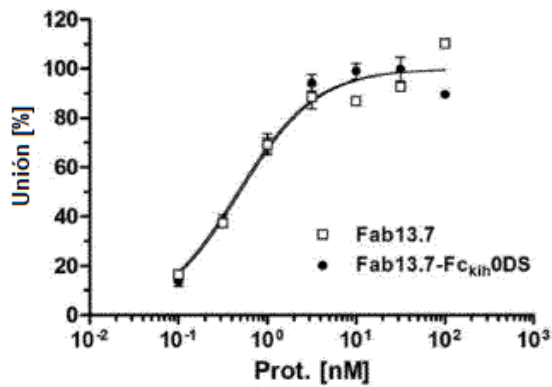
b)



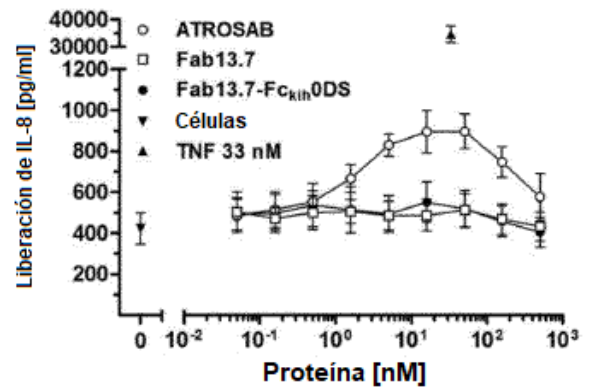
c)



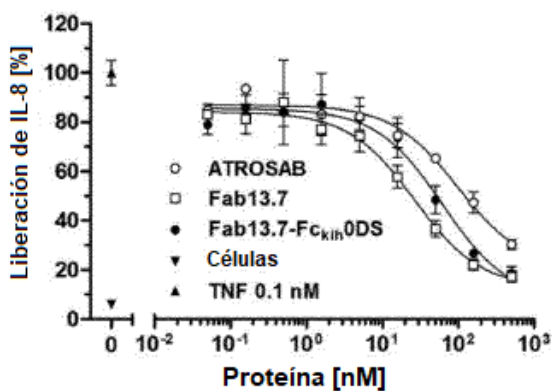
d)



e)



f)



g)

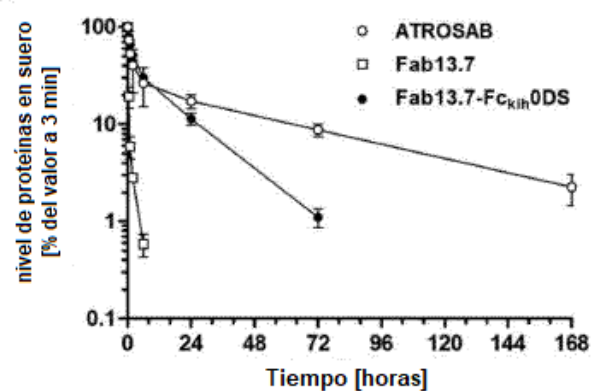
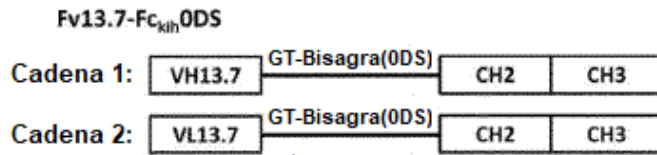
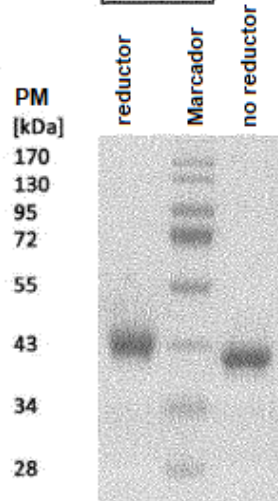


Fig. 24

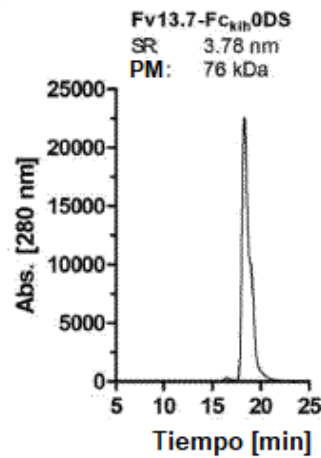
a)



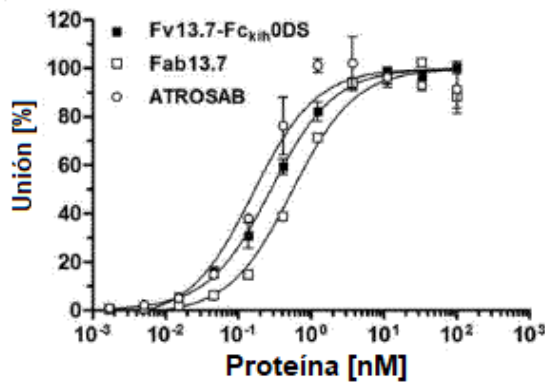
b)



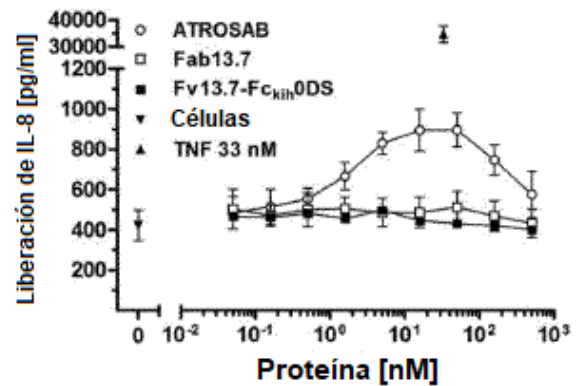
c)



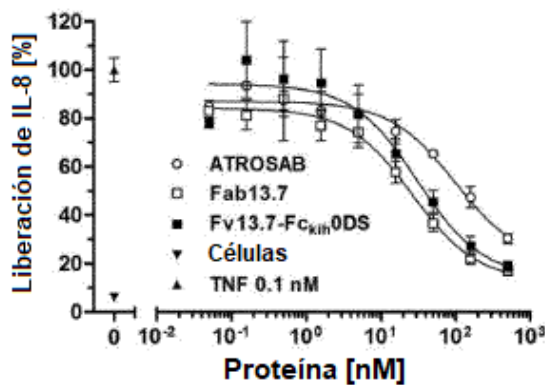
d)



e)



f)



g)

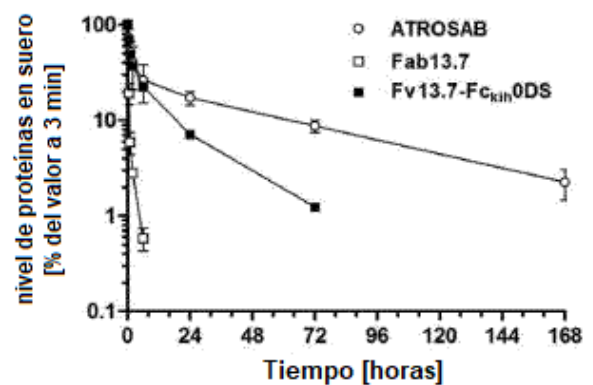


Fig. 25

SEQ ID 1: DFYIN

SEQ ID 2: EIYPYSGHAYYNEKFKA

SEQ ID 3: WDFLDY

SEQ ID 4: RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID 5: TVSNRFS

SEQ ID 6: SQSTHVPYT

SEQ ID 7: EIXPXXGXAXYNXKFKA

en el que

X en la posición 3 es cualquiera de Y o V,

X en la posición 5 es cualquiera de Y, T o S,

5 X en la posición 6 es cualquiera de S o Q,

X en la posición 8 es cualquiera de H o E,

X en la posición 10 es cualquiera de Y o K,

X en la posición 13 es cualquiera de E o D.

SEQ ID 8: SQXTHVPYT

10 en el que X en la posición 3 es cualquiera de S o G.

SEQ ID 9: EIVPTQGGEAKYNDKFKA

SEQ ID 10: EIVPXQGGEAKYNDKFKA

en el que

X en la posición 5 es cualquiera de S o G

SEQ ID 11: SQXTHVPYT

15 en el que

X en la posición 3 es cualquiera de G o S

SEQ ID 12:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPTQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
S

SEQ ID 13:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
S

Fig. 25 (continuación)

SEQ ID 14:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDFYINWIRQAPGKGLEWVSEIYPYSGHA
YYNEKFKARFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 15:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDFYINWIRQAPGKGLEWVSEIYPYSGHA
YYNEKFKARFTISADNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 16:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIKR

SEQ ID 17:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIKR

SEQ ID 18:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLHNSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIK

SEQ ID 19:

DVQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLHNSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIK

SEQ ID 20:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIPYSGH
AAYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 21:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIKR

SEQ ID 22:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIPYSGH
AAYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID 23:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGKVEIKR

SEQ ID 24:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 25 (continuación)

SEQ ID 25:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID 26:

DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
 RFSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID 27:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

SEQ ID 28:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSS
 LEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES
 AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFQHKDDNPSLPPE
 RPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADK
 ESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEI
 TKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHC
 LSEVEHDTMPADLPAAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLL
 RLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQN
 AILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLH
 EKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQI
 KKQTALAEVLKHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVGGAA
 AHHHHHH

SEQ ID 29:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTAPVLDSDGSFRL
 RSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 25 (continuación)

SEQ ID 30:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTDKHTHTSPSP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 31:

DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
 RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGTDKHTHTSPSP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 32:

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGE
 AKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVS
 SGTDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 33:

DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLSHNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLI
 YTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEI
 KGTDKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 34:

DKHTCAAA

SEQ ID 35:

DKHTCPPCPAPELLGG

SEQ ID 36:

SASV

Fig. 25 (continuación)

SEQ ID 37:
DRV T

SEQ ID 38:
SLQP

SEQ ID 39
GGLV

SEQ ID 40
NAKNSL

SEQ ID 41
LQMN

SEQ ID 42
GTDKTH TSPPCPAPPVAG

SEQ ID 43
GTDKTH TCPPSPAPPVAG

SEQ ID 44
GTDKTH TSPSPAPPVAG