



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 855**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05025025 .7**

96 Fecha de presentación : **28.11.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1666052**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-APRIL y su utilización para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer.**

30 Prioridad: **16.02.2000 US 182938 P**
22.08.2000 US 226986 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Ashkenazi, Avi, J.;**
Dodge, Kelly, H.;
Grewal, Iqbal;
Kim, Kyung, Jin;
Marsters, Scot, A.;
Pitti, Robert, M. y
Yan, Minhong

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-APRIL y su utilización para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere de forma general a la utilización de uno o más agonistas o antagonistas para modular la actividad del factor de necrosis tumoral (TNF) y de las moléculas relacionadas con el receptor del TNF (TNFR), y más especialmente, de los miembros de las familias del TNF y TNFR denominados como TALL-1, APRIL, TACI, y BCMA. La presente invención también se refiere al diagnóstico y/o el tratamiento *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo* de células de mamífero o condiciones patológicas asociadas con TALL-1, APRIL, TACI, o BCMA, usando una o más de las moléculas agonistas o antagonistas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Varias moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral- α ("TNF- α "), el factor de necrosis tumoral- β ("TNF- β " o "linfotóxina- β "), la linfotóxina- β ("LT- β "), el ligando de CD30, el ligando de CD27, el ligando de CD40, el ligando de OX-40, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1 (también denominado como ligando de Fas o ligando de CD95), el ligando de Apo-2 (también denominado TRAIL), el ligando de Apo-3 (también denominado TWEAK), la osteoprotegerina (OPG), el APRIL, el ligando de RANK (también denominado TRANCE), y el TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK), se han identificado como miembros de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [Consultar, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature*, 357:80-82 (1992), la WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; la WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Simonet *et al.*, *Cell*, 89:309-319 (1997); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); la WO98/28426 publicada el 2 de julio de 1998; la WO98/46751 publicada el 22 de octubre de 1998; la WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)]. Entre estas moléculas, se ha publicado que TNF- α , TNF- β , el ligando de CD30, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1, el ligando de Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y el ligando de Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte de la células apoptótica. Se ha publicado que tanto el TNF- α como el TNF- α inducen la muerte apoptótica en células tumorales susceptibles [Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987)].

[0003] Varias moléculas en la familia TNF tienen también un papel o papeles aparentes en la función o desarrollo del sistema inmune [Gruss *et al.*, *Blood*, 85:3378 (1995)]. Zheng *et al.* han publicado que el TNF- α está implicado en la apoptosis posterior a la estimulación de células T CD8-positivas [Zheng *et al.*, *Nature*, 377:348-351 (1995)]. Otros investigadores han publicado que el ligando de CD30 podría estar implicado en la supresión de las células T autoreactivas en el timo [Amakawa *et al.*, *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, resumen n° 10, (1995)]. El ligando de CD40 activa muchas funciones de las células B, incluyendo la proliferación, la secreción de inmunoglobulina, y la supervivencia [Renshaw *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:1889 (1994)]. Se ha publicado que otra citocina recientemente identificada de la familia del TNF, la TALL-1 (BlyS), en ciertas condiciones, induce la proliferación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas. [Moore *et al.*, ver más arriba; Schneider *et al.*, ver más arriba; Mackay *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190:1697 (1999)].

[0004] Las mutaciones en los genes del receptor o ligando de Fas/Apo-1 de ratón (denominados respectivamente *lpr* y *gld*) se han asociado con ciertos trastornos autoinmunes, indicando que el ligando de Apo-1 podría desempeñar un papel en la regulación de la supresión clonal de los linfocitos autoreactivos en la periferia [Krammer *et al.*, *Curr. Op. Immunol.*, 6:279-289 (1994); Nagata *et al.*, *Science*, 267:1449-1456 (1995)]. También se ha publicado que el ligando de Apo-1 induce la apoptosis posterior a la estimulación en linfocitos T CD4-positivos y en linfocitos B, y podría estar implicado en la eliminación de los linfocitos activados cuando ya no se necesita su función [Krammer *et al.*, ver más arriba; Nagata *et al.*, ver más arriba]. Se ha publicado que los anticuerpos monoclonales de ratón agonistas que se unen específicamente al receptor de Apo-1 exhiben una actividad para matar células que es comparable o similar a la del TNF- α [Yonehara *et al.*, *J. Exp. Med.*, 169:1747-1756 (1989)].

[0005] La inducción de varias respuestas celulares mediadas por tales citocinas de la familia del TNF se cree que se inicia por su unión a receptores celulares específicos. Previamente, se identificaron dos receptores distintos del TNF, de aproximadamente 55-kDa (TNFR1) y 75-kDa (TNFR2) [Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); EP 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991; Loetscher *et al.*, *Cell*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61:361 (1990); Smith *et al.*, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]. Se halló que esos TNFR compartían la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluyendo las regiones extramembrana, transmembrana e intracelulares. Se halló también que las porciones extracelulares de

ambos receptores también se hallaban de forma natural como proteínas unidoras de TNF solubles [Nophar, Y. *et al.*, EMBO J., 9:3269 (1990); y Kohno, T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990); Hale *et al.*, J. Cell. Biochem. suplemento 15F, 1991, p. 113 (P424)].

- 5 **[0006]** La porción extracelular de los TNFR del tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contienen un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivos de cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD) denominados del 1 al 4, que empiezan a partir del extremo NH2-terminal. [Schall *et al.*, ver más arriba; Loetscher *et al.*, ver más arriba; Smith *et al.*, ver más arriba; Nophar *et al.*, ver más arriba; Kohno *et al.*, ver más arriba; Banner *et al.*, Cell, 73:431-435 (1993)]. Existe un patrón repetitivo de CDR similar en otras varias proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento del nervio p75 (NGFR) [Johnson *et al.*, Cell, 47:545 (1986); Radeke *et al.*, Nature, 325:593 (1987)], el antígeno CD40 de la célula B [Stamenkovic *et al.*, EMBO J., 8:1403 (1989)], el antígeno OX40 de la célula T [Mallet *et al.*, EMBO J., 9:1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara *et al.*, ver más arriba, e Itoh *et al.*, Cell, 66:233-243 (1991)]. Los CDR también se hallan en las proteínas solubles T2 similares al TNFR (sTNFR) de los virus de la viruela de Shope y mixoma [Upton *et al.*, Virology, 160:20-29 (1987); Smith *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335 (1991); Upton *et al.*, Virology, 184:370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos cisteína están bien conservadas. Estos receptores a menudo se denominan de forma conjunta como miembros de la superfamilia del receptor de TNF/NGF.

- [0007]** Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta la fecha, con excepción de la linfotoxina- α , son proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. Por contra, la mayoría de los receptores en la familia del receptor del TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana del tipo I. No obstante, en ambas familias del ligando y del receptor del TNF, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha hallado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citocinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF- α , el ligando de Apo-1 y el ligando de CD40, son cortadas proteolíticamente a nivel de la superficie celular; la proteína resultante en cada caso típicamente forma una molécula homotrimérica que funciona como una citocina soluble. Las proteínas de la familia del receptor del TNF también son cortadas proteolíticamente a menudo para liberar ECD solubles del receptor que pueden funcionar como inhibidores de las citocinas cognadas.

- 30 **[0008]** Más recientemente, se han identificado otros miembros de la familia del TNFR. En von Bulow *et al.*, Science, 278:138-141 (1997), los investigadores describen un receptor de la membrana plasmática denominado como Activador Transmembrana e Interactor con CAML o "TACI". Se ha descrito que el receptor de TACI contiene un motivo rico en cisteína característico de la familia del TNFR, y que está presente tanto en células B como en células T activadas. En un ensayo *in vitro*, el entrecruzamiento de TACI, con anticuerpos específicos para TACI, sobre la superficie de células Jurkat transfectadas condujo a la activación del NF-KB. [ver también la WO 98/39361 publicada el 18 de septiembre de 1998].

- [0009]** Laabi *et al.*, EMBO J., 11:3897-3904 (1992) publicó la identificación de un nuevo gen denominado "BCM" cuya expresión se halló que coincidía con la maduración terminal de las células B. El marco de lectura abierta del ADNc normal del BCM predijo un polipéptido de 184 aminoácidos de longitud con un único dominio transmembrana. Estos investigadores más tarde denominaron este gen "BCMA." [Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22:1147-1154 (1994)]. Se informó que la expresión del ARNm del BCMA estaba ausente en las líneas de células B humanas malignas, las cuales representa la etapa pro-linfocito B, y por tanto se cree que está vinculado a la etapa de diferenciación de los linfocitos [Gras *et al.*, Int. Immunology, 7:1093-1106 (1995)]. En Madry *et al.*, Int. Immunology, 10:1693-1702 (1998), se describe la clonación del ADNc del BCMA mudo. Se ha descrito que el ADNc del BCMA mudo codifica un polipéptido de 185 aminoácidos de longitud que tiene un 62% de identidad con el polipéptido del BCMA humano. El alineamiento de las secuencias proteicas de mudo y humana reveló un motivo conservado de seis cisteínas en la región N-terminal, sugiriendo que la proteína BCMA pertenece a la superfamilia del TNFR [Madry *et al.*, ver más arriba].

- 50 **[0010]** En Marsters *et al.*, Curr. Biol., 6:750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa, de longitud completa, denominado Apo-3, el cual presenta similitud con la familia del TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteínas, y que se parece al TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio de muerte citoplasmático [ver también Marsters *et al.*, Curr. Biol., 6:1669 (1996)]. El Apo-3 ha sido denominado por otros investigadores como DR3, wsl-1, TRAMP, y LARD [Chinnaiyan *et al.*, Science, 274:990 (1996); Kitson *et al.*, Nature, 384:372 (1996); Bodmer *et al.*, Immunity, 6:79 (1997); Screaton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:4615-4619 (1997)].

- [0011]** Pan *et al.* han descrito otro miembro de la familia del receptor del TNF denominado como "DR4" [Pan *et al.*, Science, 276:111-113 (1997); ver también la WO98/32856 publicada el 30 de junio de 1998]. Se informó que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de involucrar el aparato de suicidio de la célula. Pan *et al.* descubren que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.

- [0012]** En Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997) y Pan *et al.*, Science, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el Apo2L/TRAIL [ver también la WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; la WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998]. Esa molécula se denomina

como DR5 (alternativamente, también se ha denominado como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER [Screaton *et al.*, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); WO98/35986, publicada el 20 de agosto 1998; EP 870.827, publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643, publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165, publicada el 25 de febrero de 1999; WO99/11791, publicada el 11 de marzo de 1999]. Al igual que el DR4, se ha informado que el DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de señalar la apoptosis. La estructura del cristal del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz *et al.*, Molecular Cell, 4:563-571 (1999).

- 10 **[0013]** Aún se ha identificado recientemente otro receptor que contiene un dominio de muerte, el DR6 [Pan *et al.*, FEBS Letters, 431:351-356 (1998)]. Aparte de contener cuatro dominios extracelulares putativos ricos en cisteínas y un dominio de muerte citoplasmático, se cree que el DR6 contiene una secuencia putativa de cremallera de leucina que se solapa con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolina se parece a secuencias que se unen a los dominios scr-homología-3, los cuales se hallan en muchas moléculas intracelulares transductoras de señal.

- [0014]** Un grupo adicional de receptores recientemente identificados se denomina como "receptores de señuelo", los cuales se cree que funcionan como inhibidores, en vez de como transductores de señal. Este grupo incluye el DCR1 (también denominado como TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan *et al.*, Science, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, FEBS Letters, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya *et al.*, J. Immunol., 160:3-6 (1998)] y el DCR2 (también denominado TRUND o TRAIL-R4) [Marsters *et al.*, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, Immunity, 7:813-820 (1997)], ambos son moléculas de la superficie celular, así como el OPG [Simonet *et al.*, ver más arriba; Emery *et al.*, ver más abajo] y DCR3 [Pitti *et al.*, Nature, 396:699-703 (1998)], ambas de las cuales son proteínas solubles, secretadas.

- [0015]** Los miembros adicionales recientemente identificados de la familia del TNFR incluyen el CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, y TNFL1 [Brojatsch *et al.*, Cell, 87:845-855 (1996); Montgomery *et al.*, Cell, 87:427-436 (1996); Marsters *et al.*, J. Biol. Chem., 272:14029-14032 (1997); Nocentini *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:6216-6221 (1997); Emery *et al.*, J. Biol. Chem., 273:14363-14367 (1998); WO99/04001, publicada el 28 de enero de 1999; WO99/07738, publicada el 18 de febrero de 1999; WO99/33980, publicada el 8 de julio de 1999].

- [0016]** Tal como ha sido recientemente revisado por Tewari *et al.*, TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de las citocinas proinflamatorias y coestimuladoras, de los receptores de citocinas, y de las moléculas de adhesión de células, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B [Tewari *et al.*, Curr. Op. Genet. Develop., 6:39-44 (1996)]. El NF- κ B es el prototipo de una familia de factores de transcripción diméricos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma *et al.*, Genes Develop., 9:2723-2735 (1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14:649-681 (1996)]. En su forma latente, el NF- κ B está complejoado con miembros de la familia de inhibidores I κ B; a partir de la interacción del I κ B en respuesta a ciertos estímulos, el NF- κ B liberado se transloca al núcleo, en donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción de genes. Tal como se ha descrito más arriba, los miembros de la familia del TNFR identificados hasta la fecha, o incluyen o carecen de una región dominio de muerte intracelular. Algunas moléculas TNFR que carecen de un dominio de muerte, tales como el TNFR2, CD40, HVEM y GITR, son capaces de modular la actividad del NF- κ B. [ver, por ejemplo, Lotz *et al.*, J. Leukocyte Biol., 60:1-7 (1996)].

- [0017]** Para una revisión de la familia de citocinas del TNF y sus receptores, consultar Ashkenazi y Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Gruss y Dower, ver más arriba, y Nagata, Cell, 88:355-365 (1997).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0018] La presente invención se define en las reivindicaciones.

- 55 **[0019]** Los solicitantes han hallado sorprendentemente que el ligando de la familia del TNF denominado TALL-1 se une al receptor TACI y al receptor BCMA. Los solicitantes también han hallado sorprendentemente que el ligando de la familia del TNF denominado APRIL se une a ambos, los receptores TACI y BCMA. Aunque ciertos ligandos de TALL-1 y APRIL, y ciertos receptores TACI y BCMA se han descrito previamente, no se apreció en el estado de la técnica que TALL-1 y APRIL se unan a y activen los receptores TACI y BCMA. Por tanto, la presente invención proporciona un nuevo uso médico de antagonistas de anticuerpos de estos ligandos de APRIL de acuerdo con las reivindicaciones. Los antagonistas descritos en la presente invención son útiles para, entre otras cosas, el diagnóstico o el tratamiento *in vitro*, *in situ*, o *in vivo* de células de mamífero o de condiciones patológicas asociadas con la presencia (o ausencia) de TALL-1, APRIL, TACI, o BCMA.

[0020] Los usos médicos relacionados con los métodos para el tratamiento de condiciones patológicas o enfermedades en mamíferos asociadas con, o que resultan de una expresión y/o actividad incrementada o potenciada de TALL-1 o APRIL. En los métodos de tratamiento, los antagonistas de APRIL se pueden administrar al mamífero que padece dicha condición patológica o enfermedad. Los antagonistas de APRIL contemplados para utilizar son anticuerpos anti-APRIL que son capaces de bloquear o reducir la unión del respectivo ligando a los receptores TACI o TACI y BCMA. Opcionalmente, la molécula o moléculas antagonistas utilizadas en los métodos serán capaces de bloquear o neutralizar la actividad tanto de TALL-1 como de APRIL, por ejemplo, un antagonista dual que bloquea o neutraliza la actividad tanto de TALL-1 como de APRIL. Los métodos contemplan la utilización de un único tipo de molécula antagonista o una combinación de dos o más tipos de antagonistas.

[0021] La presente invención proporciona de este modo el uso médico de antagonistas de APRIL en métodos para bloquear o neutralizar la interacción entre APRIL y TACI o TACI y BCMA de acuerdo con las reivindicaciones. Por ejemplo, un método puede comprender exponer una célula de mamífero, tal como un glóbulo blanco (preferiblemente, una célula B) a uno o más antagonistas de APRIL en una cantidad eficaz para disminuir, neutralizar o bloquear la actividad del ligando de APRIL. La célula puede estar en un cultivo celular o en un mamífero, por ejemplo un mamífero que padece, por ejemplo, una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o cáncer. De este modo, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un mamífero que padece una condición patológica, tal como una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de APRIL, tal como se describe en la presente invención.

[0022] La presente invención también da a conocer composiciones que comprenden uno o más antagonistas de APRIL de acuerdo con las reivindicaciones. Opcionalmente, las composiciones de la presente invención incluirán portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, las composiciones incluirán uno o más antagonistas de TALL-1 o antagonistas de APRIL en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de una condición patológica o enfermedad.

[0023] La presente invención también da a conocer moléculas antagonistas particulares que comprenden anticuerpos monoclonales anti-APRIL de acuerdo con las reivindicaciones. Dichos anticuerpos pueden incluir anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. También se dan a conocer en la presente invención hibridomas que secretan varios anticuerpos monoclonales anti-APRIL.

[0024] También se dan a conocer en la presente invención artículos de fabricación y kits que incluyen uno o más antagonistas de TALL-1 o antagonistas de APRIL.

[0025] La presente invención también da a conocer métodos de llevar a cabo ensayos de cribado para identificar moléculas candidatas, tales como compuestos de moléculas pequeñas, polipéptidos o anticuerpos, que actúan como agonistas o antagonistas con respecto a la interacción entre APRIL y TACI o BCMA de acuerdo con las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LAS FIGURAS

[0026]

Las FIGURAS 1A-1B muestran una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia humana nativa de TACI (SEC. N° ID.:1) (la secuencia inversa correspondiente se proporciona en SEC. N° ID.:11) y su secuencia de aminoácidos putativa (SEC. N° ID.:2).

La FIGURA 2 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia humana nativa de BCMA (SEC. N° ID.:3) (la secuencia inversa correspondiente se proporciona en SEC. N° ID.:12) y su secuencia de aminoácidos putativa (SEC. N° ID.:4).

La FIGURA 3 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia humana nativa de TALL-1 (SEC. N° ID.:5) (la secuencia inversa correspondiente se proporciona en SEC. N° ID.:13) y su secuencia de aminoácidos putativa (SEC. N° ID.:6).

Las FIGURAS 4A-4B muestran una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia humana nativa de APRIL (SEC. N° ID.:7) (la secuencia inversa correspondiente se proporciona en SEC. N° ID.:14) y su secuencia de aminoácidos putativa (SEC. N° ID.:8).

Las FIGURAS 5A-5B muestran procedimientos ilustrativos para calcular el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" respecto a la secuencia de aminoácidos denominada "PRO". Para los propósitos en la presente, la secuencia "PRO" podría ser las secuencias de TACI, BCMA, TALL-1 o APRIL mencionadas respectivamente en las FIGURAS 1, 2, 3, o 4 en la presente.

La FIGURA 6 muestra un alineamiento de las dos secuencias de aminoácidos del receptor de TACI receptor, denominadas "hTACI (265)" (SEC. N° ID.:9), que se cree que es una variante ajustada, y "hTACI", citada también en las FIGURAS 1A-1B (SEC. N° ID.:2).

Las FIGURAS 7A-7D muestran los resultados de un ensayo *in situ* de tinción de la actividad de AP. Se transfectaron células COS 7 con TACI (FIGURAS 7A-7C) o plásmido del vector (FIGURA 7D) y se incubaron con AP-TALL-1 (FIGURAS 7A, 7D); AP-TNF-alfa (FIGURA 7B); o AP-EDA (FIGURA 7C).

Las FIGURAS 8A-8H muestran los resultados, mediante análisis de transferencias Western de varios ensayos de co-inmunoprecipitación de TALL-1 o APRIL con inmunoconjugados de TACI o BCMA, tal como se describe en detalle en el EJEMPLO 2. En las FIGURAS 8A-8H, TALL-1 se denomina como "Blys/TALL-1".

Las FIGURAS 9A-9B muestran los resultados de ensayos de unión adicionales que demuestran que TALL-1 y APRIL son ligandos para TACI y BCMA. En la FIGURA 9A, se transfectaron células COS 7 con TALL-1 (9a-9c); APRIL (9d-9f); o TNF-alfa (9g-9i) y se incubaron con BCMA-Fc (9a, 9d, y 9g); TACI-Fc (9b, 9e, y 9h); o TNFR1-Fc (9c, 9f, y 9i). A continuación se lavaron las células, se fijaron, y se detectó la unión de la proteína Fc mediante anticuerpo de cabra anti-humano biotinilado seguido por Cy3-estreptoavidina. En la FIGURA 9B, se transfectaron células COS 7 con TACI (1, 2, y 3); BCMA (4, 5, y 6); o vector (7, 8, y 9) y se incubaron con medio condicionado que contenía AP-TALL-1 (1, 4, and 7), AP-APRIL (2, 5, y 8) o AP-TNF-alfa (3, 6, y 9). A continuación, se lavaron las células, se fijaron, y se tiñeron en busca de actividad AC *in situ*. En las FIGURAS 9A-9H, TALL-1 se denomina como "Blys/TALL-1".

La FIGURA 10 muestra un diagrama de barras que ilustra los resultados de un ELISA de IgM, que ensaya los efectos de las citocinas, ligandos y receptores indicados sobre la producción de IgM por parte de los PBL apuntados.

Las FIGURAS 11A-11D muestran los resultados de los ensayos, demostrando que la interacción entre TALL-1 o APRIL y TACI o BCMA resulta en la activación del NF-KB. En la FIGURA 11A, la estimulación de TACI/BCMA medió la activación del NF-KB por parte de TALL-1 o APRIL. En las FIGURAS 11B y 11C, la estimulación de TACI/BCMA medió la activación del NF-KB por parte de la cotransfección del TALL-1 o APRIL de longitud completa. En la FIGURA 11D, el tratamiento con Flag-TALL-1 de células IM-9 sin transfectar también resultó en la activación del NF-KR, según se midió en un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética.

La FIGURA 12 muestra un diagrama de barras que ilustra los resultados de un ELISA que ensaya los efectos de bloquear las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA sobre la producción de IgM específica para NP, de IgG1 de baja afinidad, y de IgG1 de elevada afinidad.

Las FIGURAS 13-1 (paneles A, B y C) y 13-2 (paneles A, B, y C) muestran el análisis inmunohistoquímico de secciones de bazo procedentes de ratones tratados con TACI-Fc o BCMA-Fc, y descritos con más detalle en el EJEMPLO 5.

La FIGURA 14A muestra los resultados de un ELISA que ensayaba la unión de varios anticuerpos anti-APRIL al Flag-APRIL.

La FIGURA 14B muestra una tabla que indica los diversos resultados de los ensayos de los anticuerpos monoclonales 3C6.4.2; 5E8.7.4; 5E11.1.2; y 5G8.2.2, incluyendo el análisis del isotipo.

Las FIGURAS 15A-15D muestran diagramas de barras que ilustran los resultados de los ELISA de unión competitiva de anticuerpos anti-APRIL 3C6.4.2 ("3C6") (FIGURA 15A); 5E8.7.4 ("5E8") (FIGURA 15B); 5E11.1.2 ("5E11") (FIGURA 15C); y 5G8.2.2 ("5G8") (FIGURA 15D), y descritos con más detalle en el EJEMPLO 9.

Las FIGURAS 16A y 16B muestran los resultados de ensayos que demuestran la inhibición de la artritis inducida por el colágeno mediante el tratamiento con TACI-Fc en un modelo con murido *in vivo*. Las observaciones de valoración artrítica se describen en el EJEMPLO 10.

Las FIGURAS 17A-17F muestran los perfiles histoquímicos y radiológicos de articulaciones de ratones CIA tratados con TACI-Fc o de controles.

Las FIGURAS 18A-18E muestran los resultados de ensayos que demuestran que TACI-Fc inhibió las respuestas inmunes anti-colágeno en el modelo con murido CIA. Las FIGURAS 18A y 18B muestran los niveles en suero de los anticuerpos anti-BCII de los isotipos IgG1 e IgG2a; la FIGURA 18C ilustra los efectos de TACI-Fc sobre las respuestas de las células T proliferantes; la FIGURA 18D ilustra los

efectos de TACI-Fc sobre la producción de IL-2 por parte de células T; la FIGURA 18E ilustra los efectos de TACI-Fc sobre la producción de interferón-gamma por parte de células T.

Las FIGURAS 19A-19B muestran los efectos inhibidores de TACI-Fc sobre la proliferación de células T ingenuas inducida por anti-CD3 (FIGURA 19A) y sobre la producción de IL-2 inducida por anti-CD3 por parte de células T ingenuas, según se midió en ensayos *in vitro*.

La FIGURA 20 muestra los resultados de un ensayo que demuestra la inhibición de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) mediante el tratamiento con TACI-Fc *in vivo* en un modelo con murido.

Las observaciones de puntuación clínica de la EAE e describen en el EJEMPLO 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

[0027] Los términos "TACI" o "polipéptido de TACI" o "receptor de TACI", cuando se usan en la presente abarcan los "polipéptidos de TACI de secuencia nativa" y las "variantes de TACI" (las cuales se definen adicionalmente en la presente). "TACI" es una denominación dada a aquéllos polipéptidos que están codificados por moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de polinucleótidos mostradas en la FIGURA 1 y variantes o fragmentos de las mismas, moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia mostrada en la FIGURA 1 y variantes de la misma, así como fragmentos de las anteriores. Los polipéptidos TACI de la invención podrían aislarse a partir de una variedad de fuentes, tales como a partir de tejidos humanos o a partir de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos.

[0028] Una "secuencia nativa" del polipéptido TACI comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TACI derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos TACI de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido TACI de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas empalmadas de forma alternativa), y variantes alélicas del polipéptido que ocurren de forma natural. Los polipéptidos TACI de la invención incluyen pero no se limitan a los polipéptidos descritos en von Bulow *et al.*, ver más arriba y WO98/39361, publicada el 11 de septiembre de 1998, la variante empalmada (denominada "hTACI(265)" más arriba y mostrada en la FIGURA 6 (SEC. N° ID.:9)), y los polipéptidos TACI que comprenden la secuencia contigua de residuos aminoácidos 1-293 de las FIGURAS 1A-1B (SEC. N° ID.:2).

[0029] Un "dominio extracelular" o "ECD" de TACI se refiere a una forma del polipéptido TACI que carece esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Ordinariamente, un ECD de polipéptido TACI tendrá menos de aproximadamente el 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplasmático, y preferiblemente tendrá menos de aproximadamente el 0,5% de tales dominios. Se sobreentenderá que cualquier dominio o dominios transmembrana identificados para los polipéptidos TACI de la presente invención se identifican siguiendo los criterios empleados rutinariamente en el campo para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana podrían variar, pero los más probable es que en no más de 5 aminoácidos en cada extremo del dominio tal como se identificó inicialmente. Las formas de ECD de TACI incluyen aquéllas descritas en von Bulow *et al.*, ver más arriba y WO98/39361.

[0030] "Variante de TACI" significa un polipéptido de TACI que tiene al menos aproximadamente un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácido de TACI o del ECD de TACI de longitud completa y secuencia nativa. Preferiblemente, tal variante de TACI actúa como un antagonista de TALL-1 o antagonista de APRIL, según se definen más abajo. Tales polipéptidos variantes de TACI incluyen, por ejemplo, los polipéptidos de TACI en donde uno o más residuos aminoácidos se añaden, o suprimen, en los extremos N- y/o C-terminales, así como dentro de uno o más de los dominios internos, de la secuencia de aminoácido de longitud completa. También se contemplan los fragmentos del ECD de TACI. Ordinariamente, un polipéptido variante de TACI tendrá al menos aproximadamente el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 81% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 82% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 83% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 84% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 86% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 87% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 88% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 89% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 91% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 92% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 93% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 94% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 96% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más

preferiblemente al menos el 97% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 98% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos el 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido TACI codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en la FIGURA 1 o un fragmento especificado de la misma. Los polipéptidos variante de TACI no abarcan la secuencia de TACI nativa. Ordinariamente, los polipéptidos variantes de TACI tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

[0031] Los términos "BCMA" o "polipéptido de BCMA" o "receptor de BCMA", cuando se usan en la presente, abarcan los "polipéptidos de BCMA de secuencia nativa" y las "variantes de BCMA" (las cuales se definen adicionalmente en la presente). "BCMA" es una denominación dada a aquellos polipéptidos que están codificados por moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de polinucleótidos mostradas en la FIGURA 2 y variantes de las mismas, moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia mostrada en la FIGURA 2 y variantes de la misma, así como fragmentos de las anteriores. Los polipéptidos BCMA de la invención podrían aislarse a partir de una variedad de fuentes, tales como a partir de tipos de tejidos humanos o a partir de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos.

[0032] Una "secuencia nativa" del polipéptido BCMA comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido BCMA derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos BCMA de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido BCMA de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas empalmadas de forma alternativa), y variantes alélicas del polipéptido que ocurren de forma natural. Los polipéptidos de BCMA de la invención incluyen los polipéptidos descritos en Laabi *et al.*, EMBO J., 11:3897-3904 (1992); Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22:1147-1154 (1994); Gras *et al.*, Int. Immunology, 7:1093-1106 (1995); Madry *et al.*, Int. Immunology, 10:1693-1702 (1998); y el polipéptido de BCMA que comprende la secuencia contigua de los residuos aminoácidos 1-184 de la FIGURA 2 (SEC. N° ID.:4).

[0033] Un "dominio extracelular" o "ECD" de BCMA se refiere a una forma del polipéptido de BCMA que carece esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Ordinariamente, un ECD del polipéptido de BCMA tendrá menos de aproximadamente el 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplasmático, y preferiblemente tendrá menos de aproximadamente el 0,5% de tales dominios. Se sobreentenderá que cualquier dominio o dominios transmembrana identificados para los polipéptidos de BCMA de la presente invención se identifican siguiendo los criterios empleados rutinariamente en el campo para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana podrían variar, pero los más probable es que en no más de 5 aminoácidos en cada extremo del dominio tal como se identificó inicialmente. Las formas de ECD de TACI incluyen aquellas descritas en Laabi *et al.*, EMBO J., 11:3897-3904 (1992); Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22:1147-1154 (1994); Gras *et al.*, Int. Immunology, 7:1093-1106 (1995); Madry *et al.*, Int. Immunology, 10:1693-1702 (1998).

[0034] "Variante de BCMA" significa un polipéptido de BCMA que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácido de BCMA o del ECD de BCMA de longitud completa y secuencia nativa. Preferiblemente, tal variante de BCMA actúa como un antagonista de TALL-1 o antagonista de APRIL, según se definen más abajo. Tales polipéptidos variantes de BCMA incluyen, por ejemplo, los polipéptidos de BCMA en donde se añaden, o suprimen, uno o más residuos aminoácidos en los extremos N- y/o C-terminales, así como dentro de uno o más de los dominios internos, de la secuencia de aminoácido de longitud completa. También se contemplan los fragmentos del ECD de BCMA. Ordinariamente, un polipéptido variante de BCMA tendrá al menos aproximadamente el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 81% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 82% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 83% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 84% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 86% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 87% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 88% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 89% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 91% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 92% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 93% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 94% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de la

secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 96% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 97% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos el 98% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos el 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido BCMA codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en la FIGURA 2 o un fragmento especificado de la misma. Los polipéptidos variante de BCMA no abarcan la secuencia de TACI nativa. Ordinariamente, los polipéptidos variantes de BCMA tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

[0035] Los términos "TALL-1" o "polipéptido de TALL-1", cuando se usan en la presente, abarcan los "polipéptidos de TALL-1 de secuencia nativa" y las "variantes de TALL-1". "TALL-1" es una denominación dada a aquellos polipéptidos que están codificados por moléculas de ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de polinucleótidos mostradas en la FIGURA 3 y variantes de las mismas, moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia mostrada en la FIGURA 3 y variantes de la misma, así como fragmentos de las anteriores que tienen la actividad biológica de la secuencia nativa de TALL-1. Las variantes de TALL-1 preferiblemente tendrán al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y aún más preferiblemente al menos el 9% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido TALL-1 de secuencia nativa mostrados en la FIGURA 3. Una "secuencia nativa" del polipéptido TALL-1 comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TALL-1 derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos TALL-1 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido TALL-1 de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas empalmadas de forma alternativa), y variantes alélicas del polipéptido que ocurren de forma natural. El término "TALL-1" incluye aquellos polipéptidos descritos en Shu *et al.*, n° de acceso de GenBank AF136293; WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; EP 869.180 publicada el 7 de octubre de 1998; WO98/27114 publicada el 25 de junio de 1998; WO99/12964 publicada el 18 de marzo de 1999; WO99/33980 publicada el 8 de julio de 1999; Moore *et al.*, ver más arriba; Schneider *et al.*, ver más arriba; y Mukhopadhyay *et al.*, ver más arriba.

[0036] Los términos "APRIL" o "polipéptido de APRIL", cuando se usan en la presente, abarcan los "polipéptidos de APRIL de secuencia nativa" y las "variantes de APRIL". "APRIL" es una denominación dada a aquellos polipéptidos que están codificados por moléculas de ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de polinucleótidos mostradas en la FIGURA 4 y variantes de las mismas, moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia mostrada en la FIGURA 4 y variantes de la misma, así como fragmentos de las anteriores que tienen la actividad biológica de la secuencia nativa de APRIL. Las variantes de APRIL preferiblemente tendrán al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y aún más preferiblemente al menos el 9% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido APRIL de secuencia nativa mostrados en la FIGURA 4. Una "secuencia nativa" del polipéptido APRIL comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido APRIL derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos APRIL de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido APRIL de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas empalmadas de forma alternativa), y variantes alélicas del polipéptido que ocurren de forma natural. El término "APRIL" incluye aquellos polipéptidos descritos en Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); n° de acceso de GenBank AF046888; WO 99/00518 publicada el 7 de enero de 1999; WO 99/12965 publicada el 18 de marzo de 1999; WO 99/33980 publicada el 8 de julio de 1999; WO 97/33902 publicada el 18 de septiembre de 1997; WO 99/11791 publicada el 11 de marzo de 1999; EP 911.633 publicada el 28 de marzo de 1999; y WO99/50416 publicada el 7 de octubre de 1999.

[0037] "Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos", en relación a las secuencias polipeptídicas de ligando o receptor identificadas en la presente, se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en una tal secuencia de ligando o receptor identificado en la presente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máxima porcentaje de identidad de la secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento, para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, puede conseguirse de varias formas que se hallan dentro de los conocimientos del campo, por ejemplo, usando programas de ordenador disponibles públicamente, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos capacitados en la técnica pueden terminar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmos necesarios para conseguir el

alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. Sin embargo, para los propósitos en la presente, los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe más abajo, usando el programa de ordenador para comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la tabla siguiente. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla siguiente se ha registrado con la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el n° de U.S. Copyright Registration TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., o podría compilarse a partir del código fuente proporcionado en la tabla siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para ser usado en un sistema operativo UNIX, preferiblemente el UNIX V4.0D de Digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

TABLA - CÓDIGO FUENTE

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */      { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */      { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */      {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */      { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */      { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */      {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -3, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */      { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */      {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */      {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */      {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */      {-2, -3, -6, -4, -3, 2, 4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */      {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */      { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */      {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */      { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */      { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */      {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */      { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */      { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */      { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */      {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */      {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */      { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1        1      /* penalty per base */
#define PINS0        8      /* penalty for a gap */
#define PINS1        4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 - 1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          jmp;        /* current jmp index */
    struct jmp     jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;      /* output file name */
char              *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char              *prog;       /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int               dmax;        /* best diag: nw() */
int               dmax0;       /* final diag */
int               dna;         /* set if dna: main() */
int               endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int               len0, len1;   /* seq lens */
int               ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int               smax;        /* max score: nw() */
int               *xbm;        /* bitmap for matching */
long              offset;      /* current offset in jmp file */
struct diag       *dx;         /* holds diagonals */
struct path       pp[2];       /* holds path for seqs */

char              *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char              *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int      ac;
    char     *av[ ];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";        /* output file */

    nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                 /* get the actual jmps */
    print();                     /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                 /* unlink any tmp files */
}

```

main

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int        *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;               /* score for each type */
    int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register    id;                /* diagonal index */
    register    ij;                /* jmp index */
    register    *col0, *coll;     /* score for curr, last row */
    register    xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_calloc("to get coll", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                coll[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                coll[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            coll[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[ ]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a sequeame
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256      /* maximum output line */
#define P_SPC    3        /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen;                /* set output line length */
FILE *fx;                /* output file */

print()                  print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                      /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;          /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100. * (double)nm / (double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];      /* ptr to current element */
static char  *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                 */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i] + +];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i] + +];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int    ix;        /* index in out[ ] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int    ix;
{

```

nums

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax + P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[ ] is current element (from 1)
 * nc[ ] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px & 0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

```

```

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */

```

static

stars()

stars

```

{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *out[0] == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *out[1] == ' '))
        return;

    px = star;
    for (i = lmax + P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A'] && xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homngXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char     *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char    *file;      /* file name */
    int     *len;       /* seq len */

    char     line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int      natgc, tlen;
    FILE     *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    char *msg; /* program, calling routine */
    int nx, sz; /* number and size of elements */

    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                            readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...readjumps

```

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1 */
            /*
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
            */
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
{
    int    ix;
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

writejumps

[0038] Para los propósitos en la presente, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A respecto a, con, o contra una determinada secuencia de aminoácidos B (lo que puede redactarse alternativamente como una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de aminoácidos respecto a, con o contra una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es el número de residuos aminoácidos anotados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y en donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de aminoácidos de la secuencia B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B respecto A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de la secuencia de aminoácidos, las FIGURAS 5A-5B demuestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" respecto la secuencia de aminoácidos denominada "PRO".

[0039] A menos que se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtuvieron tal como se ha descrito más arriba usando el programa de ordenador para comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos podría haberse determinado también usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de sitio web de Internet de los NCBI. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se ajustan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = sí, hebra = todas, acontecimientos esperados = 10, longitud mínima para la baja complejidad = 15/5, valor e para "multi-pass" = 0,01, constante para "multi-pass" = 25, disminución para el alineamiento final espaciado = 25, y matriz de puntuación = BLOSUM62.

[0040] En las situaciones en las que se emplea el NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A respecto a, con, o contra una determinada secuencia de aminoácidos B (lo que puede redactarse alternativamente como una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de aminoácidos respecto a, con o contra una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es el número de residuos aminoácidos anotados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento por el programa de A y B, y en donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de aminoácidos de la secuencia B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B respecto A.

[0041] El término "etiquetado con epítipo", cuando se usa en la presente, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene bastantes residuos como para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es bastante único, de forma que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta apropiados tienen generalmente al menos seis residuos aminoácidos, y usualmente entre 8 y 50 residuos aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos aminoácidos).

[0042] Tal como se usa en la presente, el término "inmunoadesina" designa las moléculas parecidas a un anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, la cual es distinta del sitio de reconocimiento y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de un dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua, que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina podría obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, la IgA (incluyendo la IgA-1 y la IgA-2), la IgE, la IgD o la IgM.

[0043] El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TALL-1, polipéptido APRIL, o ambos, TALL-1 y APRIL, *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. Los ejemplos de tales actividades biológicas de los polipéptidos TALL-1 y APRIL incluyen la unión de TALL-1 o APRIL a TACI o BCMA, la activación del NF-KB y la activación de la proliferación y de la secreción de Ig por parte de las células B, las condiciones relacionadas con la inmunidad, tales como la artritis reumatoide, así como aquéllas mencionadas adicionalmente en la literatura. Un antagonista podría funcionar de manera directa o indirecta. Por ejemplo, el antagonista podría funcionar para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TALL-1, polipéptido APRIL, o ambos, TALL-1 y APRIL, *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*, a resultados de su unión directa a TALL-1, APRIL, TACI o BCMA. El antagonista también podría funcionar indirectamente para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TALL-1, polipéptido APRIL, o ambos, TALL-1 y APRIL, *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*, a resultados, por ejemplo, de bloquear o inhibir otra molécula efectora. La molécula antagonista podría comprender una actividad antagonista "dual", en donde la molécula es capaz de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente una actividad biológica de ambos, TALL-1 y APRIL.

[0044] El término "agonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que potencia, estimula o activa parcial o completamente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TACI, polipéptido BCMA, o ambos, TACI y BCMA, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Los ejemplos de tales actividades biológicas de TACI y BCMA incluyen la activación del NF-KB, la inducción de la producción y secreción de inmunoglobulina, y la proliferación celular, así como aquéllas mencionadas adicionalmente en la literatura. Un agonista podría funcionar de manera directa o indirecta. Por ejemplo, el agonista podría funcionar para potenciar, estimular o activar parcial o totalmente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TACI, polipéptido BCMA, o ambos, TACI y BCMA, *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*, a resultados de su unión directa a TACI o BCMA, lo que causa la activación del receptor o la transducción de la señal. El agonista podría funcionar también indirectamente para potenciar, estimular o activar parcial o totalmente una o más de las actividades biológicas del polipéptido TACI, polipéptido BCMA, o ambos, TACI y BCMA, *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*, a resultados de, por ejemplo, estimular otra molécula efectora que causa a continuación la activación del receptor o la transducción de la señal de TACI o BCMA. Se contempla que un agonista podría actuar como una molécula potenciadora que funciona indirectamente para potenciar o incrementar la activación o actividad de TACI o BCMA. Por ejemplo, el agonista podría potenciar la actividad del TALL-1 o APRIL endógenos en un mamífero. Esto podría conseguirse, por ejemplo, pre-complejando el TACI o BCMA, o estabilizando los complejos de los respectivos ligandos con el receptor de TACI o de BCMA (tal como estabilizando el complejo nativo formado entre TALL-1 y TACI o APRIL y TACI).

[0045] El término "antagonista de TALL-1" o "antagonista de APRIL" se refiere respectivamente a cualquier molécula biológica que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente la actividad biológica de TALL-1 o APRIL, o ambos, TALL-1 y APRIL, e incluye, pero no se limita a, las formas solubles del receptor TACI o del receptor BCMA, tal como una secuencia de dominio extracelular de TACI o BCMA, las inmunoadesinas del receptor TACI, las inmunoadesinas del receptor BCMA, las proteínas de fusión de TACI, las proteínas de fusión de BCMA, las formas modificadas covalentemente del receptor TACI, las formas modificadas covalentemente del receptor BCMA, las variantes de TACI, las variantes de BCMA, los anticuerpos contra el receptor TACI, los anticuerpos contra el receptor BCMA, los anticuerpos contra TALL-1, y los anticuerpos contra APRIL. Para determinar si una molécula antagonista de TALL-1 bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de TALL-1 o APRIL, podrían realizarse ensayos para verificar el efecto o efectos de la molécula antagonista sobre, por ejemplo, la unión de TALL-1 o APRO a TACI o a BCMA, o la activación del NF-KB, por parte del ligando respectivo. Tales ensayos podrían realizarse en formatos de ensayo *in vitro* o *in vivo* conocidos, por ejemplo, en células que expresan BCMA y/o TACI. Preferiblemente, el antagonista de TALL-1 empleado en los procedimientos descritos en la presente será capaz de bloquear o neutralizar al menos un tipo de actividad de TALL-1, la cual podría determinarse opcionalmente en ensayos tales como los descritos en la presente. Para determinar si una molécula antagonista de APRIL bloquea,

inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de TALL-1 o APRIL, podrían realizarse ensayos para verificar el efecto o efectos de la molécula antagonista sobre, por ejemplo, la unión de TALL-1 o APRO a TACI o a BCMA, o la activación del NF-KB, por parte del ligando. Tales ensayos podrían realizarse en formatos *in vitro* o *in vivo* conocidos, por ejemplo, usando células transfectadas con TACI o BCMA (o ambos, TACI y BCMA) (preferiblemente transfectados en niveles relativamente bajos). Preferiblemente, el antagonista de APRIL empleado en los procedimientos descritos en la presente será capaz de bloquear o neutralizar al menos un tipo de actividad de APRIL, la cual podría determinarse opcionalmente en ensayos tales como los descritos en la presente. Opcionalmente, un antagonista de TALL-1 o un antagonista de APRIL será capaz de reducir o inhibir la unión de uno de los dos, TALL-1 o APRIL (o ambos, TALL-1 y APRIL), al TACI o al BCMA en al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 99%, y los más preferiblemente, en el 100%, en comparación con una molécula control negativa, en un ensayo de unión. En una realización, el antagonista de TALL-1 o el antagonista de APRIL comprenderán anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de otro ligando o anticuerpo al TACI o BCMA. Los procedimientos para determinar la especificidad del anticuerpo y la afinidad por la inhibición competitiva son conocidos en la técnica [consultar, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); Colligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, Green Publishing Assoc., NY (1992; 1993); Muller, Meth. Enzym., 92:589-601 (1983).

[0046] Los términos "antagonista de TACI" o "antagonista de BCMA" se refieren respectivamente a cualquier molécula que potencia, estimula o activa parcial o completamente una actividad biológica de TACI BCMA, o ambos, TACI y BCMA, e incluye, pero no se limita a los anticuerpos anti-receptor TACI y los anticuerpos anti-receptor BCMA. Para determinar si una molécula antagonista de TACI potencia, estimula o activa parcial o totalmente una actividad biológica de TACI o BCMA, podrían realizarse ensayos para verificar el efecto o efectos de la molécula agonista sobre, por ejemplo, los PBL o las células transfectadas con TACI o BCMA. Tales ensayos podrían realizarse en formatos conocidos de ensayo *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, el agonista de TACI empleado en los procedimientos descritos en la presente será capaz de potenciar o activar al menos un tipo de actividad de TACI, la cual podría determinarse opcionalmente en ensayos tales como los descritos en la presente. Para determinar si una molécula agonista de BCMA potencia, estimula o activa parcial o totalmente una actividad biológica de BCMA o TACI, podrían realizarse ensayos para verificar el efecto o efectos de la molécula agonista sobre, por ejemplo, una actividad de APRIL o TACI. Tales ensayos podrían realizarse en formatos de ensayo *in vitro* o *in vivo* conocidos, por ejemplo, usando PBL o células transfectadas con TACI o BCMA. Preferiblemente, el agonista de TACI o el agonista de BCMA serán capaces respectivamente de estimular o activar el TACI o BCMA, hasta el punto conseguido por el ligando nativo de los receptores TACI o BCMA.

[0047] El término "anticuerpo" se usan en el sentido más amplio, y específicamente abarca, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales simples contra el TALL-1, APRIL, TACI, o BCMA, las composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, los anticuerpos de cadena simple, y los fragmentos de anticuerpos.

[0048] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que podrían estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único sitio antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan en cultivos de hibridomas, sin contaminación por parte de otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo en el sentido que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe limitarse en el sentido de requerir la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento determinado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonados para ser usado de acuerdo con la presente invención podrían prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o podrían prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente n° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también podrían aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

[0049] Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos", en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga de, las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie determinada, o pertenecientes a una determinada clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadena son idénticas con, u homólogas de, las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal que exhiban la actividad biológica deseada (patente estadounidense n° 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los procedimientos para preparar anticuerpos quiméricos son conocidos en el campo.

[0050] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como los Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de los anticuerpos unidoras de antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de la

inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales se remplazan residuos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor con residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o conejo, que tienen especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv se remplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados podrían comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR ni en las secuencias estructurales importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más y maximizar las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, consultar Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED□, en donde la región unidora de antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macacos con el antígeno de interés. Los procedimientos para preparar anticuerpos humanizados son conocidos en el campo.

[0051] Los anticuerpos humanos pueden producirse también usando varias técnicas conocidas en el campo, incluyendo las bibliotecas de exhibición en fago. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991).

[0052] "Aislado," cuando se usa para describir los diversas proteínas descritas en la presente, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína, y podrían incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (2) hasta su homogeneidad según SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos uno componente del entorno natural de la proteína no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, la proteína aislada se preparará mediante al menos un paso de purificación.

[0053] "Tratamiento" o "terapia" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.

[0054] Mamífero, para los propósitos de tratamiento o terapia, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los humanos, los animales domésticos y de granja, de zoológicos y de deportes, o los animales de compañía, tales como los perros, los caballos, los gatos, las vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

[0055] "Condición patológica relacionada con TALL-1" y "condición patológica relacionada con APRIL" se refieren respectivamente a patologías o condiciones asociadas con niveles anormales de expresión o actividad de TALL-1 o APRIL, por encima de, o inferiores a los niveles de expresión o actividad en mamíferos sanos normales, en donde tales niveles excesivos o disminuidos ocurren de forma sistémica, localizada, o en un tejido o tipo celular o ubicación en el cuerpo determinado. Las condiciones patológicas relacionadas con TALL-1 y las condiciones patológicas relacionadas con APRIL incluyen las enfermedades crónicas relacionadas con la inmunidad y el cáncer.

[0056] Los términos "cáncer", "canceroso" y "maligno" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular descontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, el carcinoma, incluyendo el adenocarcinoma, el linfoma, el blastoma, el melanoma, el sarcoma y la leucemia. Los ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen el carcinoma de célula escamosa, el cáncer pulmonar de célula pequeña, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, el cáncer de páncreas, el glioblastoma, el cáncer de cuello de útero, el cáncer de ovarios, los cánceres de hígado, tales como el carcinoma hepático y hepatoma, el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorectal, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de la glándula salivar, los cánceres de riñón, tal como el carcinoma de célula renal y los tumores de Wilm, el carcinoma de célula basal, el melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el cáncer de testículos, el cáncer de esófago, y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello. Opcionalmente, el cáncer expresará, o tendrá asociados con la célula cancerosa, el TALL-1, APRIL, TACI o BCMA. A modo de ejemplo, se ha publicado en la literatura que los cánceres de colon, pulmón y melanoma expresan APRIL. Los cánceres preferidos para su tratamiento en la presente incluyen el linfoma, leucemia, mieloma, y los subtipos de los mismos, tales como el linfoma de Burkitt, el mieloma múltiple, la leucemia linfoblástica aguda o la leucemia linfocítica, los linfomas de Hodgkin y de no Hodgkin, y la leucemia mieloide aguda.

[0057] El término "enfermedad relacionada con la inmunidad" significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero causa, media o contribuye de otro modo a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen las enfermedades en las que la estimulación o la intervención de la respuesta inmunitaria tienen un efecto de mejoría sobre la progresión de la enfermedad. Se incluyen dentro de este término las enfermedades autoinmunes, las enfermedades inflamatorias inmunomediadas, las enfermedades inflamatorias no inmunomediadas, las enfermedades infecciosas, y las enfermedades de inmunodeficiencia. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con la inmunidad y enfermedades inflamatorias, algunas de las cuales son inmunitarias o están mediadas por células T, que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, la artritis crónica juvenil, las espondiloartropatías, la esclerosis sistémica (esclerodermia), las miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), el síndrome de Sjogren, la vasculitis sistémica, la sarcoidosis, la anemia autoinmune hemolítica (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismal), la trombocitopenia autoinmune (trombocitopenia idiopática púrpura, trombocitopenia inmune-mediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), la diabetes mellitus, la enfermedad renal inmunomediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como la esclerosis múltiple, la polineuropatía desmielinizante idiopática, y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; las enfermedades hepato biliares, tales como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), la hepatitis activa crónica autoinmune, la cirrosis biliar primaria, la hepatitis granulomatosa, y la colangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerante: enfermedad de Crohn), la enteropatía sensible al gluten, y la enfermedad de Whipple, las enfermedades de la piel autoinmunes o inmunomediadas, incluyendo las enfermedades ampollas de la piel, el eritema multiforme y la dermatitis por contacto, la psoriasis, las enfermedades alérgicas tales como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, la hipersensibilidad a la comida y la urticaria, las enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como las neumonías eosinofílicas, la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad; las enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo el rechazo del injerto y la enfermedad del injerto contra el huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen el SIDA (infección por VIH), la hepatitis A, B, C, D y E, las infecciones bacterianas, las infecciones fúngicas, las infecciones por protozoos y las infecciones parasitarias.

[0058] "Enfermedad autoinmune" se usa en la presente en un sentido amplio, general, para referirse a los trastornos o condiciones en mamíferos en los que la destrucción del tejido normal o sano surge a partir de respuestas inmunitarias humorales o celulares del mamífero individual contra sus propios constituyentes tisulares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el lupus eritematoso, la tiroiditis, la artritis reumatoide, la psoriasis, la esclerosis múltiple, la diabetes autoinmune, y la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

[0059] El término "agente citotóxico", tal como se usa en la presente, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya los isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), los agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

[0060] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de la enfermedad. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen la adriamicina, la doxorubicina, la epirubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina ("Ara-C"), la ciclofosfamida, la tiotepa, el busulfán, la citoxina, los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y el doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), el toxotero, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, el CPT-11, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorelbina, el carboplatino, la teniposida, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver patente estadounidense nº 4.675.187), el melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal, tales como el tamoxifén y la onapristona.

[0061] Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en la presente, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una etapa distinta de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención en G1 y en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen el vincas (vincristina y vinblastina), el taxol, y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etoposido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también desbordan hacia la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN tales como el tamoxifén, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el Ara-C. Puede hallarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, editores Mendelsohn e Israel, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la p. 13.

[0062] El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citocinas incluyen las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorelaxina; las hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor- α y - β de la necrosis tumoral; la sustancia inhibidora de mullerian; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento del nervio; el factor de crecimiento de las plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF) tales como el TGF- α y TGF- β ; el factor-I y -II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones tales como el interferón- α , - β , y - γ ; los factores estimuladores de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL), tales como las IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores polipéptidos tales como el LIF y el ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

II. Procedimientos y materiales

[0063] Generalmente, los procedimientos de la invención para modular la actividad de TALL-1, APRIL, TACI, y/o BCMA en células de mamífero comprenden la exposición de las células a una cantidad deseada de antagonista o agonista que afecta la interacción de TALL-1 o APRIL con TACI o BCMA. Preferiblemente, la cantidad de antagonista o agonista empleado será una cantidad efectiva para afectar la unión y/o actividad del ligando respectivo o del receptor respectivo, para conseguir un efecto terapéutico. Esto puede conseguirse *in vivo* o *ex vivo* de acuerdo, por ejemplo, con los procedimientos descritos más adelante en los ejemplos. Las condiciones o trastornos ilustrativos a ser tratados con tales antagonistas de TALL-1 o antagonistas de APRIL incluyen condiciones en mamíferos denominadas clínicamente como enfermedades autoinmunes, incluyendo, pero no limitándose a, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la psoriasis y el lupus, u otras condiciones patológicas en las que la respuesta o respuestas de las células B en los mamíferos están anormalmente reguladas al alza, tales como el cáncer. Tal como se muestra en los ejemplos siguientes, las moléculas inmuno adhesinas de TACI inhibieron sustancialmente la enfermedad artrítica inducida por la inmunización con colágeno del tipo-II, redujeron la inflamación articular y la formación de anticuerpos anti-colágeno, impidieron la destrucción del hueso y del cartílago, y bloquearon la estimulación de células T autoreactivas. Estos resultados implican el TACI en la autoinmunidad mediada por células T, y sugiere que el bloqueo o la inhibición de las interacciones de TACI con TALL-1 y/o APRIL podría tener una utilidad terapéutica para las enfermedades autoinmunes como la RA. Las condiciones o trastornos ilustrativos a ser tratados con agonistas de TACI o agonistas de BCMA incluyen la inmunodeficiencia y el cáncer.

[0064] En la presente también se describen métodos de diagnóstico. Por ejemplo, los antagonistas o agonistas se pueden utilizar para detectar los respectivos ligandos (TALL-1 o APRIL) o receptores (TACI o BCMA) en mamíferos que se sabe o se sospecha que tienen una condición patológica relacionada con TALL-1 o una condición patológica relacionada con APRIL. La molécula antagonista o agonista se puede utilizar, por ejemplo, en inmunoensayos para detectar o cuantificar el TALL-1 o APRIL en una muestra. Una muestra, tal como las células obtenidas de un mamífero, se pueden incubar en presencia de una molécula antagonista o agonista marcada, y se puede realizar la detección del antagonista o agonista marcado unido en la muestra. Dichos ensayos, incluyendo varios procedimientos de ensayo clínicos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describen en Voller *et al.*, Immunoassays, University Park, 1981.

A. MATERIALES

[0065] Los antagonistas y agonistas que pueden emplearse en los procedimientos incluyen, pero no se limitan a las formas solubles de los receptores TACI y BCMA, las inmuno adhesinas del receptor TACI y las inmuno adhesinas del receptor BCMA, las proteínas de fusión de TACI o BCMA, las formas modificadas covalentemente de TACI o BCMA, las variantes del receptor TACI y del receptor BCMA, los anticuerpos contra el receptor TACI o BCMA, y los anticuerpos contra TALL-1 o APRIL. Más adelante se describen varias técnicas que pueden emplearse para preparar los antagonistas y agonistas.

[0066] Generalmente, las composiciones de la presente invención se pueden preparar usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. La descripción siguiente se refiere a métodos para producir dichos polipéptidos mediante el cultivo de células huéspedes transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico codificante, y la recuperación del polipéptido del cultivo celular. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

[0067] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el polipéptido deseado podría insertarse dentro de un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Hay varios vectores disponibles públicamente. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales se describe más abajo. En el campo se conocen secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias terminadoras de la transcripción opcionales que podrían emplearse y se describen con más detalle en WO97/25428.

[0068] Los vectores de clonación y expresión usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped, y que está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico codificante. Los promotores son secuencias no traducidas ubicadas cadena arriba (5') respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 p.b.) que controla la transcripción y traducción de una determinada secuencia de ácido nucleico a la cual está unido operativamente. Tales promotores típicamente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles incrementados de transcripción a partir del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento se conocen bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huéspedes potenciales. Estos promotores se unen operativamente al ADN codificante, extrayendo el promotor del ADN fuente mediante la digestión con un enzima de restricción, e insertando la secuencia promotora aislada en el vector.

[0069] Los promotores apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas son conocidos en el campo, y se describen con más detalle en WO97/25428.

[0070] La construcción de vectores apropiados, que contienen uno o más de los componentes listados más arriba, emplea técnicas de ligación estándares. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados pueden cortarse, ajustarse, y religarse de la forma deseada para generar el plásmido necesario. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación pueden usarse para transformar la *E. coli* K12 cepa 294 (ATCC 31.446) y los transformantes exitosos pueden seleccionarse por resistencia a la ampicilina o tetraciclina según sea apropiado. Los plásmidos para los transformantes se preparan, analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian usando técnicas estándares conocidas en el campo. [Consultar, por ejemplo, Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981); Maxam *et al.*, Methods in Enzymology, 65:499 (1980)].

[0071] Podrían emplearse vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamíferos del ADN codificante. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de tal forma que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión [Sambrook *et al.*, ver más arriba]. Los sistemas de expresión, que comprenden un vector de expresión apropiado y una célula huésped, permiten la identificación positiva práctica de los polipéptidos codificados por los ADN clonados, así como el examen rápido de tales polipéptidos en busca de propiedades biológicas o fisiológicas.

[0072] En Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060; y EP 117.058 se describen otros procedimientos, vectores y células huéspedes apropiados para su adaptación a la síntesis de los polipéptidos deseados en cultivos de células vertebradas recombinantes.

[0073] Las células huéspedes apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente incluyen las células de procariota, de levadura o de eucariota superior. Los procariotas apropiados incluyen, pero no se limitan a las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, las enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descubierta en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), pseudomonas tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticos.

[0074] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión apropiados para los vectores. Las células huéspedes apropiadas para la expresión de polipéptidos glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de todas esas células huéspedes se describen adicionalmente en WO97/25428.

[0075] Las células huéspedes se transfectan y preferiblemente transforman con los vectores de expresión o clonación descritos más arriba, y se cultivan en medio nutritivo modificado según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0076] La transfección se refiere a la captura de un vector de expresión por parte de una célula huésped, sin importar si de hecho se expresa algún secuencia codificante. Hay numerosos procedimientos de transfección conocidos por el especialista ordinariamente capacitado, por ejemplo, el CaPO_4 y la electroporación. La transfección exitosa generalmente se reconoce cuando ocurre cualquier indicación de la operación de este vector dentro de la célula huésped.

[0077] Transformación significa introducir ADN en un organismo de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, tal como se describe en Sambrook *et al.*, ver más arriba, o la electroporación se usan generalmente con los procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales de pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Además, las plantas podrían transfectarse usando el tratamiento con ultrasonidos tal como se describen en WO 91/00358, publicada el 10 de enero de 1991.

[0078] Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, podría emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huéspedes de células de mamífero se han descrito en la patente estadounidense n° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también podrían usarse otros procedimientos para introducir el ADN en las células, tales como mediante la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o los policondones, por ejemplo, el polibreno, la poliornitina. Para información sobre varias técnicas para transformar células de mamífero, consultar Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

[0079] Las células procariotas podrían cultivarse en medios de cultivo apropiados como se describe de forma general en Sambrook *et al.*, ver más arriba. Los ejemplos de medios de cultivo disponibles comercialmente incluyen el F10 de Ham (Sigma), el medio esencial mínimo ("MEM", Sigma), el RPMI-1640 (Sigma), y el medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de tales medios podría suplementarse según fuera necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como la insulina, transferrina o el factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como el cloruro sódico, el calcio, el magnesio, y el fosfato), tampones (tales como el HEPES), nucleósidos (tales como la adenosina y la timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente en concentraciones finales del orden micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario podría incluirse también en las concentraciones apropiadas, las cuales serán conocidas por los especialistas en el campo. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el especialista ordinariamente capacitado.

[0080] En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamífero pueden hallarse en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, editor M. Butler, (IRL Press, 1991).

[0081] Los polipéptidos expresados podrían recuperarse del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque podrían recuperarse también a partir de lisados de la célula huésped cuando se producen directamente sin una señal secretoria. Si el polipéptido está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana usando una solución detergente apropiada (por ejemplo Triton-X 100), o su región extracelular podría liberarse mediante corte enzimático.

[0082] Cuando el polipéptido se produce en una célula recombinante distinta de una de origen humano, está libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, habitualmente es necesario recuperar o purificar el polipéptido de proteínas o polipéptidos de la célula recombinante para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas. Como un primer paso, el medio de cultivo o lisado podría centrifugarse para eliminar los restos celulares en partículas. Los siguientes son procedimientos ilustrativos de los procedimientos de purificación apropiados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; la precipitación con etanol; la HPLC de fase inversa; la cromatografía en columnas de sílice o con una resina de intercambio catiónico tal como la DEAE; el cromatografía; la SDS-PAGE; la precipitación con sulfato amónico; la filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y las columnas de Proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como la IgG.

[0083] Las variantes del receptor TACI y las variantes del receptor BCMA se contemplan para su uso. Dichas variantes se pueden preparar usando cualquier técnica apropiada en el sector. Las variantes del receptor se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del receptor, y/o mediante la síntesis del polipéptido del receptor deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos del receptor posteriores a la traducción, tales como cambiando el número o posición de los sitios de glicosilación o alterando las características de anclaje a la membrana.

[0084] Las variaciones en la secuencia nativa del receptor o en varios dominios del receptor descritas en la presente, pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservadoras y no conservadoras establecida, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.364.934. Las variaciones podrían ser una sustitución, una supresión o inserción de uno o más codones que codifican el receptor, la cual resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos del receptor en comparación con el polipéptido del receptor de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación resulta en la sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del receptor. La guía para determinar qué residuo aminoácido podría insertarse, sustituirse o suprimirse sin afectar de forma adversa la actividad deseada, podría hallarse comparando la secuencia del receptor con la de moléculas de proteína homólogas conocidas, y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de remplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como en la sustitución de una leucina con una serina, es decir, sustituciones de aminoácido conservadoras. Las inserciones o supresiones podrían estar opcionalmente en el rango de aproximadamente de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida podría determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y ensayando las variantes resultantes en busca de la actividad exhibida por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

[0085] En la presente se proporciona fragmentos polipeptídicos de TACI o BCMA. Tales fragmentos podrían estar truncados en los extremos N-terminal o C-terminal, o podrían carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido del receptor. Opcionalmente, los fragmentos del polipéptido TACI o BCMA comprenden las variantes por supresión del ECD, en las cuales uno o más residuos aminoácidos han sido suprimidos del los extremos N-terminal o C-terminal de la secuencia del ECD del receptor. Preferiblemente, tales variantes por supresión del ECD tienen al menos una actividad biológica en comparación con la secuencia nativa del receptor.

[0086] Los fragmentos de TACI o BCMA podrían prepararse mediante cualquiera de un cierto número de técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados podrían sintetizarse químicamente. Una estrategia alternativa implica generar fragmentos del receptor mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con un enzima que se sabe corta las proteínas en sitios definidos por determinados residuos aminoácidos, o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción apropiados y aislando el fragmento deseado. Aún otras técnicas apropiadas implican aislar y amplificar un fragmento de ADN, que codifica un fragmento polipeptídico deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR.

[0087] En realizaciones particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la TABLA 1 bajo el epígrafe de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones ilustrativas en la TABLA 1, o como se describe adicionalmente más abajo en referencia a las clases de aminoácidos.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; leu norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; ile met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	tyr; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0088] Se consiguen modificaciones sustanciales, en función de la identidad inmunológica del polipéptido del receptor, seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efectos sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que ocurren de forma natural se dividen en grupos en base a sus propiedades de cadena lateral comunes:

- 10 (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
 (3) ácidos: asp, glu;
 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0089] Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar miembros de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también podrían introducirse en los sitios de sustitución conservados o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

20 **[0090]** Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en el campos, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida contra un sitio), el barrido con alanina, y la mutagénesis con PCR. La mutagénesis dirigida contra un sitio, Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de la restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas
 25 pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir el ADN variante.

[0091] El análisis de aminoácidos por barrido puede emplearse también para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran los aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen la alanina, la glicina, la serina y la
 30 cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo, porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere típicamente porque es el aminoácido más común. Además, frecuentemente se halla tanto en posiciones enterradas como expuestas. [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución con
 35 alanina no rinde cantidades adecuadas de la variante, entonces puede usarse un aminoácido isostérico.

[0092] Las formas solubles de los receptores TACI o receptores BCMA también se pueden utilizar como antagonistas en los métodos. Dichas formas solubles de TACI o BCMA pueden comprender o consistir en dominios extracelulares del respectivo receptor (y que carece de los dominios transmembrana e intracelulares del respectivo
 40 receptor). Las propias secuencias del dominio extracelular de TACI o BCMA se pueden usar como antagonistas, o se pueden modificar adicionalmente tal como se describe a continuación (tal como mediante la fusión a una inmunoglobulina, un epítipo etiqueta, o una cremallera de leucina). Se han descrito en la literatura ciertas regiones del dominio extracelular de TACI y BCMA, y pueden definirse adicionalmente usando técnicas conocidas por el experto en la materia. Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar, sin demasiada experimentación,
 45 una secuencia deseada de dominio extracelular de TACI o BCMA para utilizarla como antagonista.

[0093] Las moléculas de inmunoadhesina también se contemplan para su uso en los métodos de la presente invención. Las inmunoadhesinas del receptor TACI pueden comprender varias formas de TACI, tales como el polipéptido de longitud completa, así como las formas solubles del receptor, que comprenden una secuencia del
 50 dominio extracelular (ECD) o un fragmento de la secuencia del ECD. La molécula puede comprender una fusión del receptor TACI con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la inmunoadhesina, dicha fusión puede ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig

preferiblemente incluyen la sustitución de una forma soluble (con el dominio transmembrana suprimido o desactivado) del polipéptido del receptor en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. La fusión con inmunoglobulina puede incluir la bisagra, y las regiones CH2 y CH3, o la bisagra, y las regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones con inmunoglobulina, véase también la patente estadounidense n° 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995, y Chamow *et al.*, TIBTECH, 14:52-60 (1996).

[0094] El diseño más simple y más sencillo de inmuno adhesina combina el dominio o dominos de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Ordinariamente, cuando se preparan las inmuno adhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio unidor de la adhesina se fusionará de forma C-terminal respecto el ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de una inmunoglobulina, sin embargo, también son posibles las fusiones N-terminales.

[0095] Típicamente, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos los dominios bisagra, CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se hacen en el extremo C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminales respecto el CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente en la cadena ligera. El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; los sitios concretos son bien conocidos y podrían seleccionarse con objetos de optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la inmuno adhesina.

[0096] En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona al extremo N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar la región constante entera de la cadena pesada a la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferiblemente, en la fusión se usa una secuencia que empieza en la región bisagra, justo cadena arriba del sitio de corte con papaína que define químicamente la Fc de IgG (es decir, el residuo 216, tomando el 114 como primer residuo de la región constante de la cadena pesada), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de la adhesina se fusiona a (a) la región bisagra y C_H2 y C_H3, o (b) los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3 de una cadena pesada de IgG.

[0097] Para las inmuno adhesinas biespecíficas, las inmuno adhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructura básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen las IgG, IgD e IgE. En las inmunoglobulinas de mayor peso molecular se repite una unidad de cuatro cadenas; la IgM existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también podrían existir en forma multimérica en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades podría ser la misma o diferente.

[0093] Varios inmuno adhesinas ensambladas ilustrativas dentro del ámbito de la presente se diagraman esquemáticamente más abajo:

- (a) AC_L-AC_L;
- (b) AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, o V_LCL-AC_H);
- (c) AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, V_LCL-AC_H, o V_LCL-V_HCH)
- (d) AC_L-V_HCH-(AC_H, o AC_L-V_HCH, o V_LCL-AC_H);
- (e) V_LCL-AC_H-(AC_L-V_HCH, o V_LCL-AC_H); y
- (f) (A-Y)_n-(V_LCL-V_HCH)₂,

en donde cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesinas idénticas o diferentes;

- V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;
- V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;
- C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;
- C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;
- n es un entero superior a 1;
- Y designa el residuo de un agente entrecruzador covalente.

[0099] En interés de la brevedad, las estructuras anteriores sólo muestran las características claves; no indican la unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando tales dominios se requieren para la actividad de unión, no deben construirse para que estén presentes en las ubicaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

[0100] Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre las secuencias de la cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de tal forma que se obtenga una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, bien entre la bisagra y el dominio C_H2, bien

entre los dominios C_H2 y C_H3. Construcciones similares han sido publicadas por Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991).

[0101] Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no se requiere en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente, o asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina, o fusionada directamente a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina se coexpresa típicamente con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina. A partir de la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera estarán asociadas covalentemente para proporcionar una estructura similar a una inmunoglobulina, la cual comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidos por disulfuros. Los procedimientos apropiados para la preparación de tales estructuras se descubren, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 4.816.567, concedida el 28 de marzo de 1989.

[0102] La forma más conveniente de construir las inmunoadhesinas es fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción adhesina en pauta con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. No obstante, también puede usarse la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (consultar, por ejemplo, Aruffo *et al.*, Cell, 61:1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.*, Cell, 66:1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias regulatorias de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican las regiones constantes de la cadena pesada de IgG pueden aislarse en base a secuencias publicadas procedentes de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos del bazo o de la sangre periférica, mediante técnicas de hibridación o de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulinas de la inmunoadhesina se insertan en tándem en el vector plasmídico que dirige la expresión eficiente en las células huéspedes escogidas.

[0103] Los ejemplos de tales secuencias de ECD solubles incluyen los polipéptidos que comprenden los aminoácidos 2-166 de la secuencia TACI mostrada en la FIGURA 1, y descritas adicionalmente en los ejemplos de más abajo. La inmunoadhesina de receptor TACI puede prepararse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el campo.

[0104] Las inmunoadhesinas de receptor BCMA pueden construirse similarmente. Los ejemplos de secuencias de ECD solubles para uso en la construcción de inmunoadhesinas de BCMA podrían incluir los polipéptidos que comprenden los aminoácidos 5-51 de la secuencia BCMA mostrada en la FIGURA 2, y descritos adicionalmente en los ejemplos de más abajo.

[0105] El receptor TACI o BCMA podría modificarse covalentemente uniendo el polipéptido del receptor a una de uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), el polipropilenglicol, o los polioxialquilenos, de la manera establecida en las patentes estadounidenses n° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Tales formas pegiladas del receptor TACI o BCMA podrían prepararse usando técnicas conocidas en el campo.

[0106] Las formas con cremallera de leucina de estas moléculas también se contempla en la invención. "Cremallera de leucina" es un término en el campo usado para referirse a una secuencia rica en leucinas que potencia, promueve o dirige la dimerización o trimerización de su pareja de unión (por ejemplo, la secuencia o molécula a la cual está fusionada la cremallera de leucina). Se han descrito varios polipéptidos de cremallera de leucina en el campo. Consultar, por ejemplo, Landschulz *et al.*, Science, 240:1759 (1988); la patente estadounidense n° 5.716.805; WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341:24 (1989). Los especialistas en la técnica apreciarán que una secuencia de cremallera de leucina podría fusionarse en cualquiera de los extremos 5' ó 3' de la molécula del receptor TACI o BCMA.

[0107] Los polipéptidos TACI o BCMA de la presente invención podrían modificarse también de una determinada manera para formar moléculas químicas mediante la fusión del polipéptido del receptor a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Preferiblemente, tal polipéptido o secuencia de aminoácido heterólogos es uno que actúa para oligomerizar la molécula química. En una realización, tal molécula química comprende una fusión del polipéptido del receptor TACI o BCMA con un polipéptido etiqueta, el cual proporciona un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en los extremos amino- o carboxi-terminales del polipéptido del receptor. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del polipéptido del receptor puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiquetado. También, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el receptor sea fácilmente purificado mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta del epítipo. Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en el campo. Los ejemplos incluyen las etiquetas de poli-histidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc tag y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo de KT3 [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de la α -tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta 10

de la proteína 10 del gen de T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

[0108] Se contempla que los anticuerpos anti-receptor TACI, los anticuerpos anti-receptor BCMA, los anticuerpos anti-TALL-1, o los anticuerpos anti-APRIL podrían emplearse también en los procedimientos descritos actualmente. Los ejemplos de tales moléculas incluyen los anticuerpos neutralizantes o bloqueadores que pueden inhibir preferiblemente la unión de TALL-1 o APRIL a los receptores TACI o BCMA. Los anticuerpos anti-TACI, anti-BCMA, anti-TALL-1 o anti-APRIL podrían ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales podrían prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizador para elicitar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizador. Alternativamente, los linfocitos podrían inmunizarse *in vitro*.

[0109] El agente inmunizador típicamente incluirá el polipéptido TACI o BCMA, o el polipéptido TALL-1 o APRIL, o una proteína de fusión de los mismos. Generalmente, o se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes que no sean mamíferos. Los linfocitos se fusionan a continuación con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión apropiado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen humano, bovino o de roedor. Usualmente se emplean líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células hibridoma podrían cultivarse en un medio de cultivo apropiado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si la célula progenitora carece del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente contendrá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

[0110] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan la expresión estable del anticuerpo con niveles elevados por parte de las células productoras del anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferibles son las líneas de mieloma múrido, las cuales pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Ca., y de la American Type Culture Collection, Manassas, Va. Las líneas celulares de mieloma humanas y las de heteromieloma de ratón-humanas también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

[0111] El medio de cultivo en el que se cultivan las células hibridoma puede ensayarse entonces para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra TACI, BCMA, TALL-1 o APRIL. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en el campo. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980). Opcionalmente, los anticuerpos anti-TACI, anti-BCMA, anti-TALL-1, o anti-APRIL tendrán una afinidad de unión de al menos 10 nM, preferiblemente, de al menos 5 nM, y más preferiblemente, de al menos 1 nM por su respectivo receptor o ligando, según se determinó en un ensayo de unión.

[0112] Una vez se han identificado las células hibridomas deseadas, los clones podrían subclonarse mediante procedimientos de dilución limitada y hacerse crecer mediante procedimientos estándares [Goding, ver más arriba]. Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0113] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones podrían aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, la Proteína A-Sepharose, la cromatografía con hidroxipatito, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

[0114] Los anticuerpos monoclonales podrían prepararse también mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos múridos). Las células hibridomas de la invención sirven como un fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, los cuales se transfieren a continuación dentro de células huéspedes tales como las células COS de simio, las células ováricas de hámster chino (CHO) o las células de mieloma, las cuales de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. El ADN también podría modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de cadena pesada y

ligera humana en lugar de las secuencias homólogas múridas [patente estadounidense nº 4.816.567; Morrison *et al.*, ver más arriba], o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es de inmunoglobulina puede sustituirse en el lugar de los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse en lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

[0115] Los anticuerpos podrían ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc con objeto de impedir el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácido o se suprimen con objeto de impedir el entrecruzamiento.

[0116] Los procedimientos *in vitro* también son apropiados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en el campo.

[0117] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen respectivamente el aislamiento de anticuerpos múridos y humanos usando bibliotecas en fagos. Las publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (rango nM) mediante la redistribución de la cadena (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas en fago muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0118] El ADN también podría modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias homólogas múridas (patente estadounidense nº 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina.

[0119] Típicamente, tales polipéptidos que no son de inmunoglobulina se sustituyen en lugar de los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen en lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

[0120] Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se denominan a menudo como residuos "importados", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR en lugar de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense nº 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, se sustituyen con residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0121] La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor se acepta entonces como armazón (FR) humano del anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa un armazón determinado derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos de un subgrupo determinado de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón podría usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

[0122] Es importante además que los anticuerpos sean humanizados con retención de la elevada afinidad por el antígeno y de otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las

secuencias progenitoras, y de varios productos humanizados conceptuales, usando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares a los especialistas en el campo. Hay disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras de conformación tridimensional probable de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unir su antígeno. De esta forma pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR procedentes del receptor, e importarse secuencias de tal forma que se consigan las características deseadas del anticuerpo, tales como una afinidad incrementada por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directa y mayoritariamente implicados en influir la unión del antígeno.

[0123] Alternativamente, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, a partir de su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de la línea germinal de inmunoglobulinas humanas en tales ratones mutantes de la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos a partir del desafío con antígenos. Consultar, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature, 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos pueden derivarse también a partir de bibliotecas de exhibición sobre fago (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech., 14:309 (1996)).

[0124] Tal como se describe en los ejemplos de más abajo, se han preparado anticuerpos anti-APRIL concretos. Cuatro de estos anticuerpos, 3C6.4.2, 5G8.2.2, 5E8.7.4, y 5E11.1.2, se han depositado en la ATCC, y se les han asignado los números de acceso PTA-1347, PTA-1345, PTA-1344 y PTA-1346. Los anticuerpos anti-APRIL descritos en la presente invención pueden tener las mismas características biológicas que los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma depositadas con los números de acceso PTA-1347, PTA-1345, PTA-1344 o PTA-1346. El término "características biológicas" se usa para referirse a las actividades o propiedades *in vitro* y/o *in vivo* del anticuerpo monoclonal, tales como la capacidad de unirse a APRIL, o de bloquear o reducir sustancialmente la unión a TACI o BCMA o la activación por APRIL. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal anti-APRIL tendrá la misma actividad bloqueadora que el anticuerpo 3C6.4.2, tal como se determina por su capacidad de bloquear la unión de APRIL a TACI o BCMA. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal anti-APRIL se unirá al mismo epítipo que el anticuerpo 5G8.2.2, el anticuerpo 5E8.7.4, el anticuerpo 3C6.4.2 o el anticuerpo 5E11.1.2 descritos en los ejemplos de más abajo. Dicha propiedad de unión a epítipo puede determinarse, por ejemplo, en un ensayo de unión por inhibición competitiva, cuyas técnicas son conocidas en el sector. Dicho anticuerpo anti-APRIL inhibirá preferiblemente de forma competitiva la unión del anticuerpo 5G8.2.2, del anticuerpo 5E8.7.4, del anticuerpo 3C6.4.2 o del anticuerpo 5E11.1.2 a APRIL. Se contempla que se pueden construir anticuerpos anti-APRIL quiméricos o humanizados (tal como usando las técnicas descritas más arriba) usando o incorporando fragmentos seleccionados o secuencias de dominios procedentes de cualquiera de los anticuerpos anti-APRIL depositados antes mencionados.

B. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

[0125] Los estudios de unión ligando/receptor podrían realizarse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitiva, los ensayos en sándwich directos e indirectos, y los ensayos de inmunoprecipitación. Los ensayos basados en células y modelos animales pueden usarse para comprender además la interacción entre los ligandos y los receptores identificados en la presente, y el desarrollo y la patogénesis de las condiciones y enfermedades mencionadas en la presente.

[0126] En una estrategia, las células de mamífero podrían transfectarse con los ligandos o receptores descritos en la presente, y analizarse la capacidad de los agonistas o antagonistas para estimular o inhibir la capacidad de unión o la actividad. Las células apropiadas pueden transfectarse con el gen deseado y monitorizarse su actividad. Tales líneas celulares transfectadas pueden usarse entonces para ensayar la capacidad de los antagonistas o agonistas para inhibir o estimular, por ejemplo, para modular la proliferación de las células B o la secreción de Ig. Las células transfectadas con la secuencia codificante de los genes en la presente pueden usarse además para identificar candidatos a fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad o el cáncer.

[0127] Además, los cultivos primarios derivados de animales transgénicos pueden usarse en los ensayos basados en células. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son bien conocidas en el campo. [ver, por ejemplo, Small *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:642-648 (1985)].

[0128] Un ensayo basado en células apropiado es la adición de ligando etiquetado con epítipo (por ejemplo, AP o Flag) a células que tienen o expresan el receptor respectivo, y el análisis de la unión (en presencia o ausencia de antagonistas prospectivos) mediante tinción y FACS con anticuerpo anti-etiqueta. En otro ensayo, se ensaya la

capacidad de un antagonista para inhibir la proliferación de células B inducida por TALL-1 o APRIL. Las células B o las líneas celulares se cultivan con TALL-1 o APRIL en presencia o ausencia de los antagonistas prospectivos, y la proliferación de las células B puede medirse mediante la incorporación de ^3H -timidina o el número de células.

5 **[0129]** Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células pueden verificarse adicionalmente usando modelos animales *in vivo*. Pueden usarse una variedad de modelos animales bien conocidos para entender aún más el papel de los agonistas y antagonistas identificados en la presente en el desarrollo y patogénesis de, por ejemplo, una enfermedad relacionada con la inmunidad o el cáncer, y para ensayar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace particularmente predictivos de las respuestas en
10 pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con la inmunidad incluyen tanto los animales no recombinantes como los recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, los roedores, por ejemplo, los modelos en muridos. Tales modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos usando técnicas estándares, por ejemplo, la inyección subcutánea, la inyección en la vena caudal, la implantación en el bazo, la implantación intraperitoneal, y la implantación bajo la
15 cápsula renal.

[0130] Por ejemplo, se conocen modelos animales para la enfermedad injerto contra huésped. La enfermedad injerto contra huésped ocurre cuando se trasplantan células inmunocompetentes en paciente inmunosuprimidos o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a los antígenos del huésped. La
20 respuesta puede variar desde inflamación grave con amenaza para la vida hasta los casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos injerto contra huésped proporcionan un medio para verificar la reactividad de la células T contra antígenos del MHC y antígenos de trasplantes menores. Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, unidad 4.3.

25 **[0131]** Un modelo animal para el rechazo del aloinjerto de piel es un medio para ensayar la capacidad de las células T para mediar la destrucción del tejido *in vivo*, la cual es indicativa de y una medida de su papel en la inmunidad antivírica e inmunidad tumoral. Los modelos más comunes y aceptados usan los injertos de piel de la cola en muridos. Repetidos experimentos han mostrado que el rechazo del aloinjerto de piel está mediado por las células T, las células T auxiliares, y las células T efectoras-asesinas, y no por anticuerpos. [Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2ª edición, editor W. E. Paul, Raven Press, NY, 1989, 889-992]. Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, unidad 4.3. Otros modelos de rechazo de trasplante que pueden usarse para ensayar las composiciones de la invención son los modelos de trasplante alógeno de corazón descritos por Tanabe, M. *et al.*, Transplantation, 58:23 (1994) y Tinubu, S. A. *et al.*, J. Immunol., 4330-4338 (1994).
30 Immunol., 4330-4338 (1994).

35 **[0132]** Los modelos animales para la hipersensibilidad de tipo retrasada proporcionan también un ensayo de la función inmune mediada por célula. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasada con una respuesta inmunitaria *in vivo* mediada por células T y caracterizada por inflamación, que no alcanza un pico hasta después de que haya transcurrido un período de tiempo después del desafío con un antígeno. Estas reacciones ocurren también
40 en enfermedades autoinmunes específicas de tejidos, tales como la esclerosis múltiple (MS) y la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo de la MS). Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, unidad 4.3.

[0133] Un modelo animal para la artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte las
45 características clínicas, histológica e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana, y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Los modelos de rata y ratón se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondral. La actividad de los compuestos de la invención contra la artritis autoinmune puede ensayarse usando los protocolos descritos en Current Protocols in Immunology, ver más arriba, unidades 15.5. Ver también el modelo que usa un anticuerpo monoclonal contra las integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A. C. *et al.*, Immunology, (1996) 88:569. El EJEMPLO 10 de más abajo describe el modelo en murido de CIA.
50

[0134] Se ha descrito un modelo de asma en el cual la hiperreactividad de la vías respiratorias inducida por antígeno, la eosinofilia pulmonar, y la inflamación se inducen sensibilizando un animal con ovoalbúmina y desafiando a continuación el animal con la misma proteína suministrada por aerosol. Varios modelos animales (cobaya, rata,
55 primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópico en humanos a partir de su desafío con antígenos en aerosol. Los modelos en muridos tienen muchas de las características del asma humana. Los procedimientos apropiados para ensayar las composiciones de la invención por su actividad y efectividad en el tratamiento del asma son descritos por Wolyniec, W. W. *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., (1998) 18:777 y las referencias citadas en la misma.

60 **[0135]** Adicionalmente, las composiciones de la presente invención se pueden analizar sobre modelos animales de enfermedades similares a la psoriasis. Los compuestos de la presente invención se pueden analizar en el modelo en ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. *et al.*, Nat. Med., (1997) 3:183, en el cual los ratones presentan lesiones cutáneas histopatológicas que parecen la psoriasis. Otro modelo apropiado es la quimera de ratón scid/piel humana preparada tal como describen Nickoloff, B. J. *et al.*, Am. J. Pathol., (1995) 146:580.

[0136] Varios modelos animales son bien conocidos para ensayar la actividad anticáncer de una composición terapéutica candidata. Estos incluyen el xenoinjerto de tumores humanos en ratones desnudos atímicos o en ratones scid/scid, o los modelos de tumor mudo genético tales como los ratones knock-out p53.

5 **[0137]** Los modelos animales recombinantes (transgénicos) pueden obtenerse introduciendo la porción codificantes de las moléculas identificadas en la presente dentro del genoma de los animales de interés, usando técnicas estándares para la producción de animales transgénicos. Los animales que sirven como diana de la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, los ratones, gatos, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y los primates no humanos, por ejemplo, los babuinos, los chimpancés y los monos. Las técnicas conocidas en el campo para introducir un transgén en tales animales incluyen la microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, patente estadounidense nº 4.873.191); la transferencia del gen mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 [1985]); el apuntamiento al gen en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell, 56:313-321 [1989]); la electroporación de embriones (Lo, Mol. Cel. Biol., 3:1803-1814 [1983]); la transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell, 57:717-73 [1989]). Para una revisión, consultar, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.736.866.

[0138] Los animales transgénicos de la presente invención incluyen aquellos que son portadores del transgén solamente en parte de sus células ("animales mosaico") El transgén pueden integrarse como un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo, en tandems de cabeza con cabeza o de cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula determinado es posible también siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6232-6236 (1992).

[0139] La expresión del transgén en los animales transgénicos puede monitorizarse mediante técnicas estándares. Por ejemplo, pueden usarse el análisis por transferencia Southern o la amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión del ARNm puede analizarse entonces usando técnicas tales como la hibridación *in situ*, el análisis por transferencia Northern, la PCR o la inmunocitoquímica. Los animales podrían examinarse adicionalmente en busca de signos de patología de enfermedad inmunitaria, por ejemplo, mediante examen histológico para determinar la infiltración de células inmunitarias en tejidos específicos o en busca de la presencia de tejido canceroso o maligno.

30 **[0140]** Alternativamente, pueden construirse animales "knock out" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en la presente, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y ADN genómico alterado, que codifica el mismo polipéptido, e introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un determinado polipéptido puede usarse para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido de acuerdo con técnicas establecidas. Un porción del ADN genómico que codifica un determinado polipéptido puede suprimirse o remplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable, el cual puede usarse para monitorizar la integración. Típicamente, se incluyen en el vector varios kilobases de ADN flanqueador inalterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [consultar, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores recombinantes homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación), y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li *et al.*, Cell, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan a continuación en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, editor E. J. Robertson, (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede implantarse a continuación en un animal nodriza hembra pseudopreñado el embrión se lleva a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares, y se usa para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knock-out pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse de ciertas condiciones patológicas, y por desarrollar condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

C. FORMULACIONES

[0141] Los antagonistas o agonistas descritos en la presente se emplean preferiblemente en un portador. Los portadores apropiados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.* Típicamente, en el portador se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del portador incluyen la solución salina, la solución de Ringer y la solución de dextrosa. El pH de la solución va preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8, y más preferiblemente desde aproximadamente 7,4 hasta aproximadamente 7,8. Será evidente para las personas formadas en el campo que ciertos portadores podrían ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración del agente que se está administrando. El portador podría estar en forma de una formulación liofilizada o en solución acuosa.

[0142] Los portadores, excipientes o estabilizantes preferiblemente no son tóxicos para las células y/o los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de

octadecil dimetil bencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el fenol, el alcohol butílico o bencílico; los alquilparabenos tales como el metil o propilparaben; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina del suero, la gelatina, o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como el TWEEN□, el PLURONICS□ o el polietilenglicol (PEG).

[0143] La formulación podrían contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente aquéllas que complementan actividades que no se afectan desfavorablemente entre ellas.

[0144] El antagonista o agonista también podría estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, respectivamente microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), es sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol A. Ed. (1980).

[0145] Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* deberían ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estéril.

[0146] Podrían prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietil-metacrilato), o el poli(vinilalcohol)), los polilácticos (patente estadounidense nº 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, el etilenvinilacetato no degradable, los copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT□ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como el etilenvinilacetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

D. MODOS DE TERAPIA

[0147] Las moléculas antagonistas o agonistas descritas en la presente son útiles en el tratamiento de varias condiciones patológicas, tales como las enfermedades inmunitarias o el cáncer. Estas condiciones pueden tratarse estimulando o inhibiendo una actividad seleccionada asociada con TALL-1, APRIL, TACI o BCMA en un mamífero, a través de la administración de uno o más antagonistas o agonistas de la invención.

[0148] La diagnosis en mamíferos de las diversas condiciones patológicas descritas en la presente puede ser hecha por el médico capacitado. Hay disponibles en el campo técnicas diagnósticas que permiten, por ejemplo, la diagnosis o detección del cáncer o la enfermedad inmunitaria en un mamífero. Por ejemplo, los cánceres podrían identificarse a través de técnicas que incluyen, pero no se limitan a la palpación, el análisis de sangre, los rayos-X, la RMN y similares. Las enfermedades relacionadas con la inmunidad también pueden identificarse fácilmente. En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos auto-reactivos contra proteínas/tejidos propios y la generación subsiguiente de inflamación inmunomediada. Hay múltiples órganos y sistemas afectados clínicamente, incluyendo los riñones, pulmones, sistema musculoesquelético, mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

[0149] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune, sistémica y crónica que implica principalmente la membrana sinovial de múltiples articulaciones, con lesión resultante del cartílago articular. La patogénesis es dependiente del linfocito T y está asociada con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra la IgG propia, con la formación resultante de inmunocomplejos que alcanzan niveles elevados en el fluido articular y en la sangre. Estos complejos podrían inducir en la articulación la marcada infiltración de linfocitos y monocitos dentro del sinovio, y los marcados cambios sinoviales subsiguientes; el espacio/fluido articular es infiltrado por células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, a menudo en un patrón simétrico. Sin embargo, también ocurre la enfermedad extra-articular en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con enfermedad articular progresiva en curso, y lesiones típicas de la fibrosis pulmonar, la vasculitis, y las úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extra-articular es el denominado síndrome de Felty, el cual ocurre más tarde en el curso de la enfermedad RA, a veces después de que la enfermedad articular haya pasado a estar quiescente, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede ir acompañado por vasculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Los pacientes desarrollan

a menudo nódulos reumatoides en el tejido subcutis que recubre las articulaciones afectadas; en etapas más tardías, los nódulos tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado celular inflamatorio mixto. Otras manifestaciones que pueden ocurrir en la RA incluyen: la pericarditis, la pleuritis, la arteritis crónica, la neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, la queratoconjuntivitis sicca, y los nódulos reumatoides.

5 **[0150]** La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza a menudo con menos de 16 años de edad. Su fenotipo tiene ciertas similitudes con la RA; algunos pacientes que son positivos para el factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y es típicamente
10 destructiva, y conduce a la anquilosis articular y al crecimiento retardado. Otras manifestaciones incluyen la uveitis anterior crónica y la amiloidosis sistémica.

[0151] Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes, y la asociación común con la expresión del producto del gen HLA-B27. Los trastornos incluyen: la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter (artritis reactiva), la artritis asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino,
15 la espondilitis asociada con la psoriasis, el inicio juvenil de la espondiloartropatía y la espondiloartropatía indiferenciada. Las características distintivas incluyen la sacroileitis con o sin espondilitis; la artritis inflamatoria asimétrica; la asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B del MHC de la clase I); la inflamación ocular, y la ausencia de anticuerpos asociados con otras enfermedades reumatoides. La célula más
20 implicada como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito CD8+ T, una célula que apunta a antígenos presentados por moléculas del MHC de la clase I. Las células CD8+ T podrían reaccionar contra el alelo HLA-B27 del MHC de la clase I como si fuera un péptido extraño expresado por moléculas de la clase I del MHC. Se ha hipotetizado que un epítipo de HLA-B27 podría imitar un epítipo antigénico de bacteria u otro epítipo antigénico de microbio y, por tanto, inducir una respuesta de células CD8 +T.

25 **[0152]** La esclerosis sistémica (esclerodermia) tiene una etiología desconocida. Una marca característica de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente, ésta es inducida por un proceso inflamatorio activo. La esclerodermia puede ser localizada o sistémica; las lesiones vasculares son comunes, y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura es un suceso temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica;
30 la lesión vascular podría ser inmunomediada. Está implicada una base inmunológica, por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y por la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. ICAM-1 está a menudo regulada al alza sobre la superficie celular de los fibroblastos en las lesiones de la piel, sugiriendo que la interacción de las células T con estas células podría tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. En el riñón, la proliferación concéntrica de la intima subendotelial que afecta las pequeñas arterias
35 arcuadas e interlobulares puede resultar en un flujo de sangre cortical renal reducido y, por tanto, en proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de la banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

[0153] Las miopatías inflamatorias idiopáticas, incluyendo la dermatomiositis, la polimiositis y otras, son
40 enfermedades de inflamación crónica del músculo, de etiología desconocida, que resultan en debilidad muscular. La lesión/inflamación del músculo es a menudo simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos están asociados con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis están dirigidos contra e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARN, implicados en la síntesis proteica.

45 **[0154]** El síndrome de Sjogren se debe a la inflamación inmunomediada y subsiguiente destrucción funcional de las glándulas lacrimales y de las glándulas salivares. Esta enfermedad puede estar asociada con, o acompañada por, enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, los cuales son ambos complejos pequeños de ARN-proteína. Las lesiones resultan en queratoconjuntivitis sicca, xerostomía, y otras manifestaciones o asociaciones, incluyendo la
50 cirrosis biliar, la neuropatía periférica o sensorial, y la púrpura palpable.

[0155] Las vasculitis sistémicas son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y subsiguiente lesión de los vasos sanguíneos, lo que resulta en la isquemia/necrosis/degeneración de los tejidos suministrados por los vasos afectados, y la eventual disfunción final del órgano en algunos casos. Las vasculitis
55 pueden ocurrir también como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades inflamatorias inmunomediadas, tales como la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades asociadas también con la formación de complejos inmunes. Las enfermedades en el grupo de la vasculitis sistémica primaria incluyen: la vasculitis sistémica necrotizante, la poliarteritis nodosa, la angitis alérgica y la granulomatosis, la poliangioma, la granulomatosis de Wegener; la granulomatosis linfomatoide; y la arteritis de células gigantes. Las
60 diversas vasculitis incluyen: el síndrome del nodo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), la vasculitis aislada del SNC, la enfermedad de Behet's, la tromboangitis obliterante (enfermedad de Buerger's) y la venulitis necrotizante cutánea. Se cree que el mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis listados se debe principalmente a la deposición de complejos de inmunoglobulina en la pared del vaso, y en la inducción subsiguiente de una respuesta inflamatoria a través de la ADCC, de la activación del complemento, o ambas.

[0156] La sarcoidosis es una condición de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido en el cuerpo; la implicación del pulmón es la más común. La patogénesis implica la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en los sitios de la enfermedad, con la subsiguiente secuela crónica que resulta de la liberación de productos local y sistémicamente activos, liberados por estos tipos celulares.

[0157] La anemia hemolítica autoinmune, incluyendo la anemia hemolítica autoinmune, la pancitopenia inmune, y la hemoglobinuria paroxística nocturna, es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados sobre la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas, incluyendo también las plaquetas) y es un reflejo de la supresión de estas células recubiertas por anticuerpos a través de la lisis mediada por el complemento y/o por los mecanismos mediados por ADCC/receptor Fc.

[0158] En la trombocitopenia autoinmune, incluyendo la púrpura trombocitopénica, y la trombocitopenia inmunomediada en otras situaciones clínicas, la destrucción/eliminación de las plaquetas ocurre a resultados de la unión del anticuerpo o complemento a las plaquetas, y la eliminación subsiguiente por mecanismos mediados por la lisis de complemento, por la ADCC o por el receptor-Fc.

[0159] La tiroiditis, incluyendo la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis juvenil linfocítica y la tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmune contra antígenos de la tiroides con producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes en, y a menudo específicas de la glándula tiroideas. Existen modelos experimentales, incluyendo modelos espontáneos: en ratas (ratas BUF y BB) y en pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de los animales con tiroglobulina, antígeno microsomal tiroideo (peroxidasa tiroidea).

[0160] La diabetes mellitus del tipo I o diabetes dependiente de la insulina es la destrucción autoinmune de las células β de los islotes pancreáticos; esta destrucción está mediada por autoanticuerpos y células T autoreactivas. Los anticuerpos contra la insulina o el receptor de la insulina pueden producir también el fenotipo de no respuesta a la insulina.

[0161] Las enfermedades renales inmunomediadas, incluyendo la glomerulonefritis y nefritis tubulointerstitial, son el resultado de la lesión al tejido renal, mediada por anticuerpos o linfocitos T, bien directamente a resultados de la producción de anticuerpos autoreactivos o de células T contra antígenos renales, o indirectamente a resultados del depósito en el riñón de anticuerpos y/o complejos inmunes que reaccionan contra otros antígenos no renales. Por tanto, otras enfermedades inmunomediadas que resultan en la formación de inmunocomplejos pueden inducir también una enfermedad renal inmunomediada como secuela indirecta. Tanto los mecanismos inmunes directos como los indirectos resultan en una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de una lesión en los tejidos renales, con el resultado del deterioro de la función del órgano y, en algunos casos, la progresión hacia el fallo renal. Ambos, mecanismos inmunes humorales y celulares pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

[0162] Se cree que las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo la esclerosis múltiple, la polineuropatía idiopática desmielinizante o síndrome de Guillain-Barre y la polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, tienen una base autoinmune y resultan en la desmielinización del nervio a resultados del daño causado a los oligodendrocitos o directamente a la mielina. En la MS hay evidencia que sugiere que la inducción y progresión de la enfermedad depende de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de los linfocitos T, que tiene, o un curso recurrente-remitente o un curso progresivo crónico. La etiología es desconocida; sin embargo, todos contribuyen: las infecciones víricas, la predisposición genética, el entorno y la autoinmunidad. Las lesiones contienen infiltrados de, predominantemente, células microgliales y macrófagos infiltrantes mediados por linfocitos T; los linfocitos T CD4+ son el tipo celular predominante en las lesiones. El mecanismo de la muerte de las células oligodendrocitos y la desmielinización subsiguiente no se conoce, pero es probable que esté dirigido por los linfocitos T.

[0163] La enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, incluyendo las neumonías eosinofílicas, la fibrosis idiopática pulmonar, y la neumonitis por hipersensibilidad podrían implicar una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada. La inhibición de esta respuesta tendría un beneficio terapéutico.

[0164] Las enfermedades de la piel autoinmunes o inmuno-mediadas, incluyendo las enfermedades de la piel ampollosa, el eritema multiforme, y la dermatitis por contacto, están mediadas por auto-anticuerpos, la génesis de los cuales depende de los linfocitos T.

[0165] La psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células procesadores de antígeno, y algunos neutrófilos.

[0166] Las enfermedades alérgicas, incluyendo el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, la hipersensibilidad a la comida, y la urticaria, son dependientes de linfocitos T. Estas enfermedades son predominantemente mediadas por la inflamación inducida por linfocitos T, la inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

[0167] Las enfermedades asociadas con los trasplantes, incluyendo el rechazo del injerto y la enfermedad del injerto-contra-el huésped (GVHD) son linfocito-T dependientes; la inhibición de la función de los linfocitos T es aliviadora.

[0168] Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria proporciona beneficio son las enfermedades infecciosas, incluyendo pero no limitándose a la infección vírica (incluyendo pero no limitándose al SIDA, hepatitis A, B, C, D, E), la infección bacteriana, las infecciones por hongos, y las infecciones por protozoos o parásitos (la molécula (o derivados/agonistas) que estimulan el MLR pueden utilizarse terapéuticamente para potenciar la respuesta inmune contra agentes infecciosos), las enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan el MLR pueden utilizarse terapéuticamente para potenciar la respuesta inmune en condiciones de inmunodeficiencia heredada, adquirida, inducida por infección (como en la infección por el VIH) o iatrogénica (es decir, como procedente de la quimioterapia) y de neoplasia.

[0169] Los antagonistas o agonistas pueden administrarse de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continuada a lo largo de un período de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Opcionalmente, la administración podría realizarse a través de la infusión con mini-bomba, usando varios dispositivos disponibles comercialmente. Los antagonistas o agonistas podrían emplearse también usando las técnicas de terapia génica que se han descrito en el campo.

[0170] Las dosificaciones y regímenes para administrar antagonistas o agonistas podrían determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones se halla dentro de los conocimientos del campo. Podrían emplearse dosificaciones únicas o múltiples. Se cree actualmente que una dosis o cantidad efectiva de antagonista o agonista usado solo podría oscilar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. El escalado de las dosis entre especies puede realizarse de una forma conocida en el campo, por ejemplo, tal como se describe en Mordenti *et al.*, Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

[0171] Cuando se emplea la administración *in vivo* de un agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normal podrían variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del mamífero, o más por día, preferiblemente aproximadamente desde 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. La guía sobre dosificaciones y procedimientos de suministro concretos se proporciona en la literatura, consultar, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que formulaciones diferentes serán efectivas para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que apunta a un órgano o tejido específico podría necesitar, por ejemplo, ser suministrada de manera distinta a la de otro órgano o tejido. Los especialistas en el campo apreciarán que la dosificación de antagonista o agonista que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del mamífero que recibirá el agonista o antagonista, de la ruta de administración, y de otros fármacos o terapias que se estén administrando al mamífero.

[0172] Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial, para la administración al paciente, es aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) del anticuerpo antagonista o anticuerpo agonista, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continuada. Una dosificación diaria típica podría oscilar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas. Sin embargo, podrían ser útiles otros regímenes de dosificación.

[0173] Opcionalmente, antes de la administración de cualquier antagonista o agonista, el mamífero o paciente puede ensayarse para determinar los niveles o actividad de TALL-1 o APRIL, o TACI o BCMA. Tales ensayos podrían realizarse mediante ELISA o FACS de muestras de suero o con leucocitos de sangre periférica.

[0174] Podría usarse un único tipo de antagonista o agonista en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, podría administrarse un antagonista de TALL-1, tal como una molécula inmunoadesina del receptor TACI. Alternativamente, el médico capacitado podría optar por emplear una combinación de antagonistas o agonistas en los procedimientos, por ejemplo, una combinación de una inmunoadesina de receptor TACI y un anticuerpo anti-APRIL. Podría ser deseable además emplear un antagonista dual, es decir, un antagonista que actúa para bloquear o inhibir tanto TALL-1 como APRIL. Una molécula antagonista tal podría, por ejemplo, unirse a epítomos conservados entre el TALL-1 y APRIL, o TACI y BCMA.

[0175] Se contempla que aún podrían emplearse terapias adicionales en el procedimiento. La otra terapia u otras terapias podrían incluir, pero no limitarse a, la administración de terapia de radiación, citocina(s), agente(s) inhibidor(es) de crecimiento, agente(s) quimioterapéutico(s), agente(s) citotóxico(s), inhibidores de la tirosina quinasa, inhibidores de la transferasa ras farnesil, angiogénesis, inhibidores, e inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina, los cuales son conocidos en el campo y se definen adicionalmente particularmente en la SECCIÓN 1 anterior. Además, las terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que apuntan a los antígenos del tumor diana, tales como el RituxanTM o HerceptinaTM, así como los anticuerpos anti-angiogénicos tales como el anti-VEGF.

[0176] La preparación y programación de la dosificación para los agentes quimioterapéuticos podría usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o según sea determinado empíricamente por el médico capacitado. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service, Ed. M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico podría preceder, o seguir la administración de, por ejemplo, un antagonista, o podrían administrarse simultáneamente al mismo. Los antagonistas podrían combinarse también con un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifén, o una anti-progesterona tal como la onapristona (consultar, EP 616.812) en dosis conocidas para tales moléculas.

[0177] Puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos, tales como los anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o al factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, pueden administrarse simultáneamente al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes descritos en la presente invención. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización, los antagonistas de la presente invención se administran simultáneamente con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido por un antagonista de la presente invención.

[0178] El antagonista o agonista (y una o más de otras terapias) podrían administrarse de forma concurrente o secuencial. A continuación de la administración de antagonista o agonista, pueden analizarse las células tratadas *in vitro*. Cuando ha habido un tratamiento *in vivo*, el mamífero tratado puede monitorizarse de varias formas bien conocidas por el médico capacitado. Por ejemplo, pueden ensayarse los marcadores de actividad de las células B, tales como la producción de Ig (no específica o específica para el antígeno).

III. Procedimientos de cribado

[0179] La presente invención también abarca procedimientos de cribado de moléculas para identificar aquellas que pueden actuar como agonistas o antagonistas de la interacción de APRIL/TACI/BCMA o de la interacción de TALL-1/TACI/BCMA tal como se define en las reivindicaciones. Dichas moléculas pueden comprender moléculas pequeñas o polipéptidos, incluyendo los anticuerpos. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, los péptidos pequeños o las moléculas similares a péptidos pequeños, los péptidos preferiblemente solubles, y los compuestos inorgánicos u orgánicos no peptídicos sintéticos. Los ensayos de cribado en busca de candidatos de fármacos se diseñan para identificar compuestos o moléculas que se unen o forman complejos con los polipéptidos de ligando o receptor identificados en la presente invención, o que, en cualquier caso, interfieren con la interacción de estos polipéptidos con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán los ensayos capaces de un cribado de elevado rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente apropiados para identificar moléculas pequeñas candidatas a fármaco.

[0180] Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, los ensayos de cribado bioquímico, los inmunoensayos, y los ensayos basados en células, los cuales están bien caracterizados en el campo.

[0181] Los ensayos para, por ejemplo, antagonistas tienen en común que buscan poner en contacto el candidato a fármaco con un polipéptido de ligando o receptor identificado en la presente, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

[0182] En los ensayos de unión, la interacción es la unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido de ligando o receptor identificado en la presente o el candidato a fármaco se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microvaloración, mediante acoplamiento covalente o no covalente. El acoplamiento no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido del ligando o receptor y secándola. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido ligando o receptor a inmovilizarse, puede usarse para anclarlo sobre una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, el cual podría marcarse mediante una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado es portador de una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada sobre la superficie indica que ha ocurrido la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no es portador de una marca, la formación del complejo puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo.

inmovilizado.

[0183] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido ligando o receptor concreto identificado en la presente, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen las estrategias tradicionales, tales como, por ejemplo, el entrecruzamiento, la co-inmunoprecipitación, y la co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden monitorizarse usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) tal como describen Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos de los activadores de la transcripción, tales como el GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno como dominio unidor de ADN, y funcionando el otro como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones precedentes (generalmente denominado como el "sistema de dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada al dominio unidor de ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas están unidas al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo control de un promotor GAL4-activado depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Un equipo completo (MATCHMAKER[®]) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible de Clontech. Este sistema puede extenderse también para mapear dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar residuos aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0184] Los compuestos o moléculas que interfieren con la interacción de un polipéptido ligando o receptor identificado en la presente y otros componentes intra- o extracelulares, puede ensayarse como sigue: usualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gene y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, podría añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para servir como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza como se ha descrito en la presente más arriba. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su pareja de reacción.

[0185] Para ensayar los antagonistas, el polipéptido ligando o receptor podría añadirse a una célula junto con el compuesto a examinarse en función de una determinada actividad, y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido de ligando o receptor indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido ligando o receptor. Alternativamente, los antagonistas podrían detectarse combinando el polipéptido ligando o receptor y un antagonista potencial con receptores o receptores recombinantes polipeptídicos unidos a membrana en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido ligando o receptor puede marcarse, tal como mediante radiactividad, de tal forma que el número de moléculas de polipéptido unidas al receptor puede usarse para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por aquellos capacitados en el campo, por ejemplo, el cribado de ligando y la separación FACS. Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5 (1991). Preferiblemente, la clonación de expresión se emplea cuando se prepara ADN poliadenilado a partir de una célula que responde al polipéptido ligando o receptor, y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en lotes y se usa para transfectar células COS u otras células que no responden al polipéptido ligando o receptor. Las células transfectadas, que se hacen crecer sobre portaobjetos de vidrio, se exponen a polipéptido ligando o receptor marcado. El polipéptido ligando o receptor puede marcarse mediante una variedad de medios, incluyen la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una quinasa de proteína específica de un sitio. A continuación de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autoradiográfico. Se identifican los lotes positivos y se preparan sublotos y transfectan de nuevo usando un proceso interactivo de subdivisión y reexamen, rindiendo eventualmente un único clon que codifica el receptor putativo.

[0186] Como una estrategia alternativa, el polipéptido ligando marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana celular o extractos que expresan la molécula del receptor. El material entrecruzado se resuelve mediante PAGE y se expone a película de rayos-X. El complejo marcado que contiene el receptor puede extraerse, resolverse en fragmentos peptídicos, y someterse a microsecuenciación de proteína. La secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación se usaría para diseñar un conjunto de sonda de oligonucleótidos degeneradas para examinar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican el receptor putativo.

IV. Artículos manufacturados

[0187] En otra realización de la invención, se proporciona un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos más arriba. El artículo manufacturado comprende un contenedor y una marca. Los contenedores apropiados incluyen, por ejemplo, las botellas, los viales, las jeringas y los tubos de

ensayo. Los contenedores podrían estar formados por una variedad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para tratar la condición, y podría tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor podría ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición podrían comprender el antagonista o antagonistas de TALL-1 o el antagonista o antagonistas de APRIL, o el agonista o agonistas de TACI, o el agonista o agonistas de BCMA. Las marca sobre, o asociada al contenedor indica que la composición se usa para tratar la condición escogida. El artículo manufacturado podría comprender además un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer, y una solución de dextrosa. Además, podría incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos del paquete con instrucciones para su uso.

[0188] Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

15 EJEMPLO 1

Identificación y clonación de expresión de TACI, un receptor para el ligando TALL-1

[0189] Se preparó una proteína quimérica, denominada "AP-TALL-1", usando la fosfatasa alcalina (AP) de placenta humana fusionada al extremo N-terminal del polipéptido TALL-1, consistente en los aminoácidos 136-285 mostrados en la FIGURA 3. La AP se obtuvo mediante ampliación por PCR usando pAptag-5 (Genhunter Corporation) como plantilla, y se fusionó y clonó en el vector de expresión, pCMV-1 Flag (Sigma), con AP en el extremo N-terminal de TALL-1. AP-TALL-1 se transfectó transitoriamente (usando el reactivo Lipofectamine; Gibco-BRL) y se expresó en células 293 de riñón embrionario humano (ATCC). AP-TNF-alfa (Pennica *et al.*, ver más abajo) se preparó de forma similar. AP-EDA (que comprende los aminoácidos 241-391 de EDA; Srivastava *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:13069-13074 (1997)) también se preparó de forma similar. El medio condicionado procedente de las células 293 transfectadas se filtró (0,45 micras), se almacenó a 4°C en un tampón que contenía HEPES 20 mM (pH 7,0) y azida sódica 1 mM, y se usó para los procedimientos de tinción celular subsiguientes.

[0190] Además, se construyó un forma de TALL-1 marcada con Flag en el extremo N-terminal en el vector pCMV-1 Flag. Para promover la trimerización de esta construcción TALL-1 marcada con Flag, se insertó una forma trimérica de secuencia de cremallera de leucina [Science, 262:1401-1407 (1993)] entre la marca Flag y el TALL-1 (consistente en los aminoácidos 136-285 de la FIGURA 3), y esta construcción se denominó "Flag-LZP-TALL-1". El Flag-LZP-TALL-1 se purificó usando gel M2-agarosa (Sigma) a partir de medio libre de suero de células 293 transfectadas con el plásmido de expresión del Flag-LZP-TALL-1.

[0191] La reactividad de AP pudo detectarse fácilmente cuando se aplicó medio condicionado por AP-TALL-1, pero no con el medio control condicionado con AP, a células IM-9 (ATCC), las cuales se ha observado presentan niveles elevados de actividad de unión de TALL-1 (no se muestran los datos). El Flag-LZP-TALL-1 purificado también se unió a las células IM-9, según se determinó mediante análisis FACS (no se muestran los datos). De forma importante, la unión de AP-TALL-1 a las células IM-9 se bloqueó efectivamente mediante preincubación con Flag-LZP-TALL-1 purificado, pero no con TNF-alfa [preparado esencialmente tal como se describe en Pennica *et al.*, *Nature*, 312:724-729 (1984)], sugiriendo que ambas formas de TALL-1 eran funcionales y que la unión respectiva de AP-TALL-1 y Flag-LZP-TALL-1 a células IM-9 era específica.

[0192] Para identificar un receptor para TALL-1, se construyó una biblioteca de expresión de ADNc en el vector pRK5 (EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) usando ARNm PolyA+ derivado de las células IM-9 [Flanagan *et al.*, *Cell*, 63:185 (1990)]. Se transfectaron lotes de 1000 clones de ADNc (Miniprep DNA (Qiagen)) procedentes de la biblioteca (usando Lipofectamine) en células COS 7 (ATCC) en placas de 6 pocillos, las cuales, transcurridas 36-48 horas, se incubaron a continuación con medio condicionado con AP-TALL-1, se lavaron y se tiñeron en busca *in situ* en busca de actividad AP. Un lote positivo se rompía en lotes sucesivamente de menor tamaño. Después de tres rondas de cribado, se identificó un único ADNc que codificaba una actividad de unión por AP-TALL-1. La secuenciación del inserto de ADNc reveló un único marco de lectura abierta, que se predijo codificaba una proteína de 265 aminoácidos. Este polipéptido de 265 aminoácidos (denominado "hTACI (265)" en la FIGURA 6), cuando se alineaba con la secuencia TACI mostrada en la FIGURA 1 (denominada "hTACI" en la FIGURA 6), reveló un elevado porcentaje de identidad de secuencia, particularmente en el ECD. El alineamiento de estas dos secuencias se muestra en la FIGURA 6. Se cree que la forma de 265 aminoácidos de TACI podría ser una variante ajustada de la secuencia TACI mostrada en la FIGURA 1.

[0193] En un ensayo *in vitro*, se sembraron células COS 7 (ATCC) en placas de 12 pocillos 24 horas antes de su transfección. Las células se transfectaron entonces con 1 microgramo de TACI (la forma de 265 aminoácidos del TACI humano descrito más arriba, clonado en el vector pRK5B vector, ver más abajo) o el plásmido vector (pRK5B) solo. 18-24 horas después de la transfección, las células se incubaron con medio condicionado que contenía AP-TALL-1, AP-TNF-alfa, o AP-EDA, durante 1 hora a temperatura ambiente, y se tiñeron *in situ* en busca de actividad AP según se describe en Tartaglia *et al.*, *Cell*, 83:1263-1271 (1995).

[0194] Tal como se muestra en la FIGURA 7, se halló que AP-TALL-1 (FIGURA 7A), pero no AP-TNF-alfa (FIGURA 7B) o AP-EDA (FIGURA 7C), se unía a células COS 7 transfectadas con TACI. El AP-TALL-1 no tiñó las células transfectadas con el plásmido vector solo (FIGURA 7D). La unión de AP-TALL-1 a las células COS 7 transfectadas con TACI fue bloqueada efectivamente por una forma marcada con Flag de TALL-1, pero no por una forma marcada con Flag de LIGHT (Mauri *et al.*, ver más arriba), otro homólogo del TNF (no se muestran los datos).

EJEMPLO 2

Unión de TALL-1 o APRIL a TACI-IgG y BCMA-IgG

[0195] Se prepararon ligando marcados con Flag tal como sigue. Los aminoácidos 82-240 de LIGHT (Mauri *et al.*, *Immunity*, 8:21-30 (1998)) se subclonaron en pCMV-1 Flag (Sigma) usando un sitio NotI para fusionar los aminoácidos 1-27 de la secuencia de marca y señal Flag cadena arriba de la secuencia LIGHT. Los aminoácidos 105-250 de APRIL (ver la FIGURA 4) se clonaron de forma similar en pCMV-1 Flag (Sigma), excepto que se usó un sitio HindIII, resultando en la fusión a los aminoácidos 1-24 de la secuencia de marca y señal Flag. Los aminoácidos 124-285 de TALL-1 (ver la FIGURA 3) se fusionaron a los aminoácidos 1-27 de la secuencia de marca y señal Flag, tal como se ha descrito más arriba para la secuencia Flag-LIGHT. AP-APRIL se preparó clonando los aminoácidos 105-250 de APRIL (ver la FIGURA 4) en un vector pCMV-1 Flag que codificaba la fosfatasa alcalina de placenta humana, de tal forma que la secuencia codificante de APRIL estaba fusionada de forma C-terminal a AP, mientras que la AP estaba fusionada de forma C-terminal a Flag. AP-TALL-1 se preparó clonando los aminoácidos 135-285 de TALL-1 (ver la FIGURA 3) en el vector pCMV-1 Flag AP, tal como se describió más arriba para AP-APRIL. Las respectivas proteínas marcadas se expresaron entonces en células 293 o en células CHO, y se purificaron usando resina M2 anti-Flag (Sigma).

[0196] Un μg de Flag-LIGHT (control), Flag-APRIL, o Flag-TALL-1, o Flag-AP-APRIL, o Flag-AP-TALL-1 humanos purificados se incubó con 1 μg de una inmunoadhesina humana purificada que contenía la fusión IgG1-Fc del ECD de DcR3 (control; Pitti *et al.*, *Nature*, 396:699-703 (1998)) o TACI o BCMA, durante la noche, a 4°C, por duplicado. Las inmunoadhesinas TACI-ECD.hFc se prepararon según los procedimientos descritos en Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:10535-10539 (1991). Las construcciones inmunoadhesinas consistían en los aminoácidos 2-166 del polipéptido TACI humano (ver la FIGURA 1). Las construcciones TACI-ECD se expresaron en células CHO usando una secuencia señal heteróloga (pre-pro tripsina aminoácidos 1-17 de pCMV-1 Flag (Sigma)) y codificando la región Fc de IgG1 cadena abajo respecto la secuencia TACI, y a continuación se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Proteína-A. Las inmunoadhesinas BCMA-ECD se prepararon mediante procedimientos descritos en Ashkenazi *et al.*, tal como se citó más arriba. Las construcciones inmunoadhesinas consistían en los aminoácidos 5-51 del polipéptido BCMA humano (ver la FIGURA 2). Las construcciones BCMA-ECD se expresaron en células CHO usando una secuencia señal heteróloga (pre-pro tripsina aminoácidos 1-17 de pCMV-1 Flag (Sigma)) y codificando la región Fc de IgG1 cadena abajo respecto la secuencia BCMA, y a continuación se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Proteína-A.

[0197] Un conjunto de reacciones (FIGURA 8; paneles A-C) se sometió a inmunoprecipitación a través del receptor-inmunoadhesina con Proteína A-agarosa (Repligen). El segundo conjunto de reacciones (FIGURA 8; paneles D-F) se sometió a inmunoprecipitación a través del ligando marcado con Flag con mAb anti-Flag-M2-agarosa (Sigma). Los inmunoprecipitados se analizaron entonces mediante transferencia Western con mAb M2 anti-Flag conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (Sigma) para detectar los ligando marcados con Flag (FIGURAS 8A-C) o con pAb de IgG anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (Amersham) para detectar las receptor-inmunoadhesinas (FIGURAS 8D-F).

[0198] Los datos muestran que Flag-LIGHT se unía a DcR3-IgG, pero no a TACI-IgG o BCMA-IgG. Flag-APRIL y Flag-AP-APRIL se unían a TACI-IgG y BCMA-IgG, pero no a DcR3-IgG. De forma similar, Flag-TALL-1 y Flag-AP-TALL-1 se unían a TACI-IgG y BCMA-IgG, pero no a DcR3-IgG. Los resultados de estos ensayos indican que APRIL y TALL-1 pueden cada uno unirse de una manera estable y específica a TACI y a BCMA.

[0199] En un ensayo de co-inmunoprecipitación realizado de forma similar, TACI-Fc (descrito en el EJEMPLO 2), HVEM-Fc (Montgomery *et al.*, ver más arriba), DR3-Fc (Chinnaiyan *et al.*, *Science*, 274:990 (1996), Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:1669 (1996)), o DR6-Fc (Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 431:351-356 (1998)) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron con Flag-TALL-1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; preparado según se describe en el EJEMPLO 2). Un conjunto de reacciones se sometió a inmunoprecipitación a través de la fusión receptor-Fc con Proteína A-agarosa (Repligen); el segundo conjunto de reacciones se sometió a inmunoprecipitación a través del ligando con anticuerpo anti-Flag. Las muestras se analizaron mediante transferencia Western, como más arriba. Flag-TALL-1 no se detectó en la co-inmunoprecipitación con anti-Fc con las construcciones de fusión con Fc de HVEM, DR3, o DR6 (FIGURA 8G). De forma opuesta, TACI-Fc no se detectó en la co-inmunoprecipitación con anti-Flag con HVEM-Fc, DR3-Fc, o DR6-Fc (FIGURA 8H).

[0200] Se realizaron ensayos adicionales para determinar si TACI podía servir como un receptor para otros miembros de la familia TNF de ligandos. Se transfectaron transitoriamente células COS 7 (ATCC) (usando el reactivo Lipofectamine) con formas de membrana de ligandos de la familia TNF. Entre los ligandos ensayados

estaban APRIL, TALL-1, 4-1 BBL, CD27L, CD30L, CD40L, EDA, FasL, GITRL, LT-alfa, OX-40L, RANKL, TNF-alfa, TNF-beta y Apo2L/TRAIL.

[0201] El TNF-alfa humano se clonó en el vector pRK5B (pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; ver Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)). Para la detección de la expresión del TNF-alfa sobre la superficie celular, se insertó una marca Flag entre el aminoácido 70 y el aminoácido 71 (usando la numeración acorde con la secuencia en Pennica *et al.*, ver más arriba). Una región extracelular de TALL-1 (aa 75-285; ver la FIGURA 3), 4-1BBL (aa 59-254; Goodwin *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23:2631-2641 (1993)), de ligando de CD27 (aa 40-193; Goodwin *et al.*, *Cell*, 73:447-456 (1993)), de ligando de CD30 (aa 61-234; Smith *et al.*, *Cell*, 73:1349-1360 (1993)), de RANKL (aa 71-317; ver WO98/28426), de ligando de Apo-2 (aa 40-281; ver WO97/25428) o de Apo-3L (aa 46-249; ver WO99/19490) se clonó individualmente en el sitio BamHI. Esto resultó en un ligando quimérico, con las regiones intracelular y transmembrana del TNF-alfa y la región extracelular de varios ligandos. Para APRIL (ver la FIGURA 4) y EDA (Srivastava *et al.*, ver más arriba), se usaron clones de ADNc de longitud completa sin la marca Flag.

[0202] A continuación se incubaron células COS 7 transfectadas con la inmunoadhesina TACI.ECD.hFc (preparada como se describió más arriba). Las células se incubaron con la TACI ECD-IgG (o una construcción TNFR1-IgG preparada como se describió en Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:10535-10539 (1991)) a 1 µg/ml durante 1 hora en PBS. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS y se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS. La tinción de las células se visualizó mediante incubación con anticuerpo anti-humano de cabra biotinilado (Jackson Labs, a una dilución de 1:200) seguida por Cy3-estreptoavidina (Jackson Labs, a una dilución de 1:200).

[0203] Para identificar ligando(s) potencial(es) de BCMA, se realizaron experimentos de unión similares, tal como se ha descrito más arriba para TACI. Se preparó una inmunoadhesina BCMA.ECD.hFc, tal como se ha descrito más arriba.

[0204] De forma similar a TACI, BCMA sólo interactuó con APRIL y TALL-1. Tal como se muestra en la FIGURA 9A, TACI-hFc y BCMA-hFc se unieron a células transfectadas con TALL-1 o April pero no con TNF-alfa. En cambio, AP-TALL-1 o AP-APRIL se unieron específicamente a células transfectadas con TACI o BCMA (FIGURA 9B).

EJEMPLO 3

Inducción de la producción de IgM por TALL-1 y APRIL, e inhibición de la inducción por TACI-IgG y BCMA-IgG

[0205] Se aislaron células mononucleares periféricas humanas (PBMC) en un gradiente de Ficoll de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio LSM, ICN/Cappel, Ohio). A continuación se obtuvieron los leucocitos de sangre periférica (PBL) a partir del PBMC usando la eliminación estándar de células que se adhieren a plástico. Los PBL se sembraron en placas de 48 pocillos (3x10⁴ células/pocillo en 0,3 ml de medio RPMI-1640 conteniendo un 10% de FBS) y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% CO₂, con PBS (control), o IL-4 (100 ng/ml, control, R&D Systems, Minneapolis, Minn.), o Flag-TALL-1 (según se describió en el EJEMPLO 2 más arriba) (1 µg/ml). Para el análisis de inhibición, se incubaron las células con cada uno de los anteriores en combinación con 20 µg/ml de TACI-IgG o BCMA-IgG (preparados como se describe en el EJEMPLO 2, más arriba), o un control de inmunoadhesina del mismo isotipo. Se recolectaron los sobrenadantes de las células y se analizaron los niveles de IgM usando un equipo de ELISA para IgM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bethyl Laboratories, TX).

[0206] Los resultados se muestran en la FIGURA 10. La IL-4, usada como un control positivo, indujo la producción de IgM en comparación con el PBS de control. TALL-1 o APRIL indujeron al menos tanta producción de IgM como la IL-4. La combinación de TALL-1 y APRIL no mostró una inducción adicional de IgM en comparación con cada ligando solo. TACI-IgG no bloqueó el efecto de la IL-4, pero bloqueó completamente el efecto de TALL-1 y/o APRIL.

[0207] BCMA-IgG no bloqueó el efecto de la IL-4, pero bloqueó sustancialmente el efecto de TALL-1 y/o APRIL, aunque no completamente. La inmunoadhesina de control no bloqueó ninguno de los ligandos. Estos resultados muestran que TALL-1 y APRIL pueden inducir la producción de IgM en PBL. Más aún, los datos muestran que TACI-IgG y BCMA-IgG pueden bloquear el efecto de TALL-1 o APRIL sobre la producción de IgM, confirmando su respectiva capacidad para unirse cada ligando y demostrando su respectiva capacidad para bloquear la actividad del ligando sobre las células diana.

EJEMPLO 4

La interacción entre TALL-1 o APRIL con TACI y/o BCMA resulta en la activación del NF-κB

[0208] Se sembraron células 293 (ATCC) 24 horas antes de la transfección a 1x10⁵ células/pocillo en placas

de 12 pocillos, y se transfectaron con 0,25 µg de plásmido del gen informador ELAM-luciferasa, 25 ng de PRL-TK (Promega) y la cantidad indicada de cada construcción de expresión (ver la FIGURA 11). La cantidad total de ADN transfectado se mantuvo constante a 1 mg mediante la suplementación con vector pRK5B vacío (ver el EJEMPLO 2). En algunos pocillos de ensayo, se añadieron ligando marcados con Flag (preparados como se describió en el EJEMPLO 2) en las concentraciones indicadas 4 horas después de la transfección. En otros pocillos de ensayo, las células se cotransfectaron con TALL-1 (FIGURA 3) o RANKL (WO98/28426) de longitud completa. Las células se recolectaron 20-24 horas después de la transfección y la actividad del gen informador se determinó con el "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Promega).

10 [0209] Sólo se observó una activación mínima del NF-κB cuando TACI o BCMA se expresaban solos a niveles bajos (tales como a 0,1 ng). Sin embargo, la activación de NF-κB aumento enormemente, bien por la adición de Flag-TALL-1 o Flag-APRIL (FIGURA 11A), o por la cotransfección con TALL-1 o APRIL de longitud completa (FIGURA 11B; 11C).

15 [0210] El tratamiento con Flag-TALL-1 de células IM-9 sin transfectar también resultó en la activación del NF-κR (ver la FIGURA 11D). Las células IM-9 (ATCC) se incubaron con Flag-TALL-1 (0,3 µg/ml) o PBS solo o en combinación con 20 µg/ml de TACI-IgG o TNFR1-IgG (preparado tal como se describió en el EJEMPLO 2). La actividad del NF-κB se midió mediante un ensayo de desplazamiento de la actividad electroforética tal como se describe en Montgomery *et al.*, *Cell*, 87:427-436 (1996); Marsters *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:14029 (1997); Chinnaiyan *et al.*, *Science*, 274:990 (1996); Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:1669 (1996); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 431:351 (1998).

[0211] Los datos sugieren que una consecuencia fisiológica de la interacción TALL-1/APRIL-TACI/BCMA es la activación de la vía NF-κB.

25

EJEMPLO 5

Inhibición de la formación del centro germinal y de la producción de anticuerpo en ratones inmunizados tratados con TACI-IgG o BCMA-IgG

30

[0212] Se realizaron ensayos *in vivo* para determinar si el bloqueo de la interacción TALL-1/TACI o TALL-1/BCMA perjudica las respuestas inmunitarias humorales. Tres grupos de ratones C57BL/6 hembra de 6-8 semanas de edad se inmunizaron intraperitonealmente (i.p.) con 100 µg de gammaglobulina de pollo conjugada con acetilo (NP23-CgG) (Biosource Technologies) precipitada en alum (4-hidroxi-3-nitrofenilo). Los grupos de animales se trataron diariamente durante 14 días con 50 µg de TACI-Fc o BCMA-Fc (preparados según se describe en el EJEMPLO 2) en 100 µl de solución salina (y los animales control se trataron con 100 µl de solución salina) mediante inyección i.p.

40 [0213] Transcurridos 14 días, los sueros de los ratones se analizaron en busca de IgM específica para NP, IgG1 de baja afinidad, e IgG1 de elevada afinidad, usando un procedimiento ELISA estándar. La IgG1 específica de NP, ambos anticuerpos de elevada afinidad, y los anticuerpos totales (alta más baja afinidad) se cuantificaron mediante ELISA en pocillos recubiertos con albúmina de suero bovino conjugada respectivamente con NP2,5 y NP23. Los anticuerpos unidos se detectaron con IgM o IgG1 anti-ratón de cabra conjugadas con AP (Pharmingen).

45 [0214] Los resultados se muestran en la FIGURA 12. TACI-Fc y BCMA-Fc inhibían sustancialmente la producción de anticuerpos de IgM específicos para NP en comparación con el control (FIGURA 12A), indicando que las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA (y las interacciones APRIL/TACI y APRIL/BCMA) eran importantes durante la fase temprana de la activación de las células B que conduce a la secreción de la IgM. TACI-Fc y BCMA-Fc también inhibían las respuestas IgG1 de baja y alta afinidad específicas para NP (FIGURA 12 B, C), sugiriendo que las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA (y las interacciones APRIL/TACI y APRIL/BCMA) son importantes también para el cambio de clase de Ig y la maduración de afinidad.

55 [0215] Durante la primera parte de una respuesta de anticuerpo específico para antígeno, las células B se diferencian en células formadoras de anticuerpos (AFC). Esto tiene lugar en las áreas extrafoliculares del bazo compuestas por vainas linfoides periarteriolares (PALS) [Gray *et al.*, *Immunology*, 65:73 (1988); Naclennan, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:117 (1988)], en donde a continuación ocurre el cambio de clase de Ig. Se compararon las regiones asociadas a PALS procedentes de bazos de ratones inmunizados con NP23-CgG, tratados durante 10 días con Ig, TACI-Fc, o BCMA-Fc, de forma similar a como se ha descrito más arriba. A continuación se realizó el análisis inmunohistoquímico de las diversas secciones del bazo. Las secciones de bazo preparadas 10 días después de la inmunización y teñidas con anti-IgG1 conjugada con FITC se muestran en la FIGURA 13-1 (panel A) y en la FIGURA 13-2 (panel A). Tal como se esperaba, los ratones control mostraron un gran número de focos de AFC agrupados que se teñían intensamente con anti-IgG1 y que contenían muchas células parecidas a inmunoblastos (FIGURA 13-1, panel A, izquierda). Por contra, los ratones tratados con TACI-Fc mostraron solamente unas pocas células aisladas IgG1-positivas, sin formación de focos de AFC (FIGURA 13-1, panel A, derecha). De igual forma, los ratones tratados con BCMA-Fc mostraron solamente unas pocas células aisladas IgG1-positivas, sin formación de

65

focos de AFC (FIGURA 13-2, panel A). Por tanto, las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA (y APRIL/TACI y APRIL/BCMA) son importantes para la diferenciación extrafolicular de células B que precede el cambio de clase de Ig en las áreas esplénicas asociadas con PALS.

- 5 **[0216]** Para estudiar el papel potencial de las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA en la maduración por afinidad del anticuerpo, se examinó la formación de centros germinales (GC) en los bazo de ratones inmunizados con NP23-CgG en el día 14. Se prepararon secciones de bazo 14 días después de la inmunización, y se tiñeron con anti-PNA conjugado con FITC (fluorescencia verde) y anti-IgM conjugado con Rojo de Texas (fluorescencia roja). Tal como se esperaba, los folículos esplénicos procedentes de controles mostraban una tinción
- 10 intensa con la aglutinina de cacahuete (PNA), una lectina que se une específicamente a células B GC (FIGURA 13-1, panel B, izquierda). En marcado contraste, los folículos esplénicos de ratones tratados con TACI-Fc estaban vacíos de GC, y mostraban sólo unas pocas, aisladas, células que se teñían con PNA (FIGURA 13-1, panel B, derecha). Los folículos esplénicos de ratones tratados con BCMA-Fc también estaban vacíos de GC, y mostraban sólo unas pocas, aisladas, células que se teñían con PNA (FIGURA 13-2, panel B).

- 15 **[0217]** A pesar de la ausencia de GC, no había anomalías en las arquitecturas foliculares esplénicas de ratones tratados con TACI-Fc o BCMA-Fc, según se juzgó mediante la tinción con hematoxilina y eosina de secciones del bazo del día 14 (FIGURA 13-1, panel C, izquierdo (controles) y panel C, derecho (tratados con TACI-Fc); y FIGURA 13-1, panel C (tratados con BCMA-Fc).
- 20 Esto sugiere que en los ratones tratados con TACI-Fc o BCMA-Fc, algunas células B foliculares se pudieron diferenciar en AFC, pero no pudieron proceder a formar GC. Por tanto, las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA (así como las interacciones APRIL/TACI y APRIL/BCMA) parecen ser críticas para la correcta formación de GC.

- 25 **[0218]** Por tanto, el bloqueo de las interacciones TALL-1/TACI y TALL-1/BCMA (o de las interacciones APRIL/TACI y APRIL/BCMA) en ratones durante la inmunización primaria inhibió varios aspectos de la respuesta de las células B: (a) la fase temprana de activación de células B extrafoliculares que conduce a la producción de IgM específica para el antígeno; (b) la diferenciación de las células B que conduce al cambio de clase de Ig; (c) la formación de GC esplénicos, en donde ocurre la maduración de afinidad y se genera la memoria de las células B.
- 30 Aunque que la formación de GC fue completamente bloqueada por TACI-Fc o BCMA-Fc, ocurrió cierta producción residual de IgM e IgG1. Que las respuestas de anticuerpos atenuadas pueden proceder, a pesar de la ausencia de GC, se ha observado en otros sistemas [ver, por ejemplo, Matsumoto *et al.*, *Nature*, 382:462 (1996); Kato *et al.*, *J. Immunol.*, 160:4788 (1998); Futterer *et al.*, *Immunity*, 9:59 (1998). Es posible que otros factores aparte de TALL-1 o APRIL y TACI o BCMA medien la producción restante de anticuerpos. Alternativamente, el tratamiento seleccionado
- 35 TACI-Fc o BCMA-Fc *in vivo* podrían no haber sido suficiente para impedir todos los sucesos de unión TALL-1/TACI, TALL-1/BCMA, APRIL/TACI o APRIL/BCMA.

- [0219]** Estudios previos indican que las interacciones CD40L-CD40 [Foy *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 14:591 (1996)] y CD86-CD28/CTLA-4 [Han *et al.*, *J. Immunol.*, 155:556 (1995); Lenschow *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 14:233 (1996)] son importantes para la entrada de células B extrafoliculares en las áreas GC y para el establecimiento en GC. La inhibición de estas interacciones a través de la eliminación de genes, o mediante tratamiento con anticuerpos bloqueadores o con fusiones receptor-Fc, disminuyen la producción de anticuerpos y bloquea la formación de GC [Lane *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:819 (1994); Durie *et al.*, *Immunol. Today*, 15:406 (1994); Hathcock *et al.*, *Science*, 262:905 (1993); Linsey *et al.*, *Science*, 257:7992 (1992); Renshaw *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:1889 (1994); Xu *et al.*, *Immunity*, 1:423 (1994); Kawabe *et al.*, *Immunity*, 1:167 (1994); Foy *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:157 (1994)]. Hay algunas similitudes sorprendentes entre los sistemas TALL-1/TACI, TALL-1/BCMA y CD40L-CD40: ambos ligandos están relacionados con el TNF y se expresan sobre células T activadas, y ambos receptores son homólogos del TNFR que estimulan el NF- κ B y se expresan sobre células B. Por tanto, la interacción de TALL-1 o APRIL con TACI o BCMA podría mediar la ayuda de las células T a células B similar a CD40L y CD40. TALL-1 también podría
- 40 contribuir a la activación de las células B por parte de células dendríticas, las cuales sí que expresan el ligando TALL-1. A diferencia de los ratones knock-out de CD40L y CD40, que exhiben respuestas de IgG deterioradas pero no las de IgM, y a diferencia de los pacientes deficientes en CD40L con síndrome de hiper-IgM [Callard *et al.*, *Immunol. Today*, 14:559 (1993); Allen *et al.*, *Science*, 259:990 (1993); Aruffo *et al.*, *Cell*, 72:291 (1993)], los ratones tratados con TACI-Fc o BCMA-Fc mostraron un déficit tanto en la producción de IgM como de IgG. Por tanto, es
- 55 posible que TALL-1 o APRIL y TACI o BCMA operen temprano en la activación de las células B, de tal forma que su bloqueo perjudica todas las fases de la respuesta humoral. Por contra, CD40L y CD40 podrían operar más tarde en la activación de las células B, de tal forma que su bloqueo perjudica sólo las fases más tardías de la respuesta de anticuerpos.

60 **EJEMPLO 6**

Preparación de anticuerpos monoclonales anti-APRIL

- [0220]** Se inmunizaron ratones Balb/c (obtenidos de los Charles River Laboratories) inyectándoles 1,0 μ g de Flag-APRIL (diluido en adyuvante MPL-TDM comprado a Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Mont.) 10 veces en cada planta de las patas traseras. La inmunización consistió en una serie de 6 inyecciones (una

inyección/semana durante 6 semanas). Los animales se dejaron descansar durante dos meses, y se administraron inyecciones de inmunización subsiguientes una vez por semana durante 4 semanas. La proteína de fusión de APRIL marcada con Flag se preparó como se describió en el EJEMPLO 2 de más arriba, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con M2 anti-Flag-agarosa (Sigma).

5

[0221] Tres días después del recuerdo final, se extrajeron los nódulos linfáticos poplíteos de los ratones, y se preparó una única suspensión celular en medio DMEM (obtenido de Biowhitakker Corp.) suplementado con un 1% de penicilina-estreptomicina. Las células de los nódulos linfáticos se fusionaron con células de mieloma múrido P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) usando polietilenglicol al 35%, y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos.

10 Los hibridomas resultantes de la fusión se seleccionaron en medio HAT. Diez días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo de hibridomas se examinaron en un ELISA para ensayar la presencia de anticuerpos monoclonales que se unieran a la proteína Flag. Como control negativo para descartar que los anticuerpos monoclonales se unieran a la porción Flag de la molécula, los anticuerpos monoclonales se examinaron también en busca de cualquier unión a Apo-3 marcada con Flag.

15

[0222] En el ELISA, se recubrieron placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) añadiendo 50 µl de 0,25 µg/ml de Flag-APRIL o Flag-Apo-3 en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, a cada pocillo e incubando a 4°C durante la noche. A continuación se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS conteniendo un 0,05% de Tween 20). Los pocillos en las placas de microvaloración se bloquearon entonces con 200 µl de albúmina de suero bovina al 2,0% en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se lavaron de nuevo las placas tres veces con tampón de lavado.

20

[0223] A continuación de los pasos de lavado, se añadieron 100 µl de los sobrenadantes de hibridoma o varias concentraciones de suero policlonal a los pocillos designados. Se añadieron 100 µl de medio condicionado con células de mieloma P3X63AgU.1 a otros pocillos designados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato agitador y se lavaron a continuación tres veces con tampón de lavado.

25

[0224] A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de Fc de IgG anti-ratón de cabra (comprado a Cappel Laboratories), conjugado con HRP, diluido 1:1000 en tampón de ensayo (0,5% de albúmina de suero bovina, 0,05% de Tween-20, 0,01% de Thimersol en PBS), y se incubaron las placas durante 1 hora temperatura ambiente en un aparato agitador. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido por la adición de 50 µl de sustrato (sustrato peroxidasa TMB microwell, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Md.) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de detención componente del TMB 1 (dietilglicol, Kirkegaard & Perry) a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector automatizado de placas de microvaloración.

35

[0225] Los sobrenadantes que daban positivo en el ELISA se clonaron a continuación dos veces mediante dilución limitante.

40

[0226] Tal como se muestra en la FIGURA 14A, se halló que los anticuerpos 3C6.4.2, 5E8.7.4, 5E11.1.2 y 5G8.2.2 se unían a Flag-APRIL.

EJEMPLO 7

45

Isotipado de los anticuerpos anti-APRIL

[0227] Los isotipos de los anticuerpos monoclonales anti-APRIL (ver EJEMPLO 6) se determinaron recubriendo placas con Ig anti-ratón, de cabra, específicas de isotipo (Fisher Biotech, Pittsburgh, Pa.) a 4°C durante la noche. Después de bloquear los sitios de unión no específicos con 2% de BSA, se añadieron 100 µl de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma o 0,5 µg/ml de los mAb purificados. Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se incubaron con Ig anti-ratón, de cabra, conjugada con HRP, durante 30 minutos a temperatura ambiente. El nivel de HRP unida a la placa se detectó usando sustrato de HRP como se ha descrito más arriba.

55

[0228] Tal como se muestra en la tabla en la FIGURA 14B, se halló que los anticuerpos anti-APRIL 5E8.7.4, 5E11.1.2 y 3C6.4.2 eran anticuerpos del isotipo IgG2a. Se halló que el anticuerpo anti-APRIL 5E11.1.2 era un anticuerpo del isotipo IgG1.

60

EJEMPLO 8

Ensayo de unión que muestra la actividad de bloqueo de los mAb anti-APRIL

[0229] Se recubrieron placas de microvaloración (Nunc, Dinamarca) con 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc humano (Boehringer Mannheim) a 5 µg/ml en tampón carbonato, durante la noche, a 4°C. las placas se

65

bloquearon entonces con 150 μ l/pocillo de BSA 2% en tampón PBS, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Las inmunoadhesinas respectivas, BCMA-IgG o TACI-IgG (preparadas como se describe en el EJEMPLO 2 anterior) se añadieron en un volumen de 50 μ l/pocillo a 5 μ g/ml en tampón de bloqueo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Todos los anticuerpos (los cuales se identificaron en la fusión descrita en el EJEMPLO 6), se diluyeron a 1:100 y se añadieron 25 μ l/pocillo a la placa junto con 25 μ l/pocillo de 2 μ g/ml de Flag-APRIL (ver EJEMPLO 2) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La señal se reveló con sucesivas incubaciones con anticuerpo anti-Flag biotinilado (Sigma Aldrich, Missouri) y peroxidasa de rábano silvestre (Amersham Life Science, New Jersey). Todos los pasos, excepto el primero, estuvieron precedidos por un paso de lavado con PBS/0,01% Tween 20.

Identificación del mAb	% de unión máxima a BCMA	SD	% de unión máxima a TACI	SD
3C6.4.2	10	0	18	0
5E8.7.4	96	2	88	6
5E11.1.2	65	0	52	4
5G8.2.2	101	5	94	9
IgG Ctrl	100	0	100	0

[0230] Tal como se muestra en la tabla anterior, el anticuerpo 3C6.4.2 anti-APRIL bloqueó efectivamente la unión de APRIL a BCMA y a TACI. En el ensayo, el anticuerpo 5E11.1.2 también mostró un bloqueo parcial de APRIL a BCMA y a TACI.

EJEMPLO 9

ELISA de unión competitiva

[0231] Para determinar si los anticuerpos anti-APRIL 3C6.4.2, 5E8.7.4, 5E11.1.2 y 5G8.2.2 (descritos en los ejemplos anteriores) reconocían el mismo o diferentes epítomos, se realizó un ELISA de unión competitiva tal como se describe en *J. Immunol. Methods*, 156:9-17 (1992) usando anticuerpos biotinilados anti-APRIL. Los anticuerpos monoclonales anti-APRIL se biotinilaron usando N-hidroxilsuccinimida tal como se describe en *J. Immunol. Methods*, 156:9-17 (1992). Se recubrieron pocillos de microvaloración con 50 μ l de 0,5 μ g/ml de Flag-APRIL (EJEMPLO 2) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, durante la noche, a 4°C. Después del lavado, se bloquearon los sitios de unión no específica con 200 μ l de BSA al 2% durante 1 hora. Después del lavado, se añadió a cada pocillo una mezcla de concentración óptima predeterminada de anticuerpos anti-APRIL biotinilados, y un exceso de 100 veces de anticuerpos monoclonales no marcados. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se detectó la cantidad de anticuerpo biotinilado anti-APRIL mediante la adición de HRP-estreptoavidina. Después de lavar los pocillos de microvaloración, se detectó el enzima unido mediante la adición de sustrato, y las placas se leyeron a 450 nm con un lector de placas de ELISA.

[0232] Los resultados se muestran en la FIGURA 15. Los datos muestra que el anticuerpo 3C6.4.2 y el anticuerpo 5E11.1.2 podrían reconocer epítomos compartidos puesto que los anticuerpos no marcados 3C6.4.2 o 5E11.1.2 eran capaces de inhibir la unión de ambas formas biotiniladas a los anticuerpos (Bio-3C6.4.2, Bio-5E11.1.2). Ambos anticuerpos, 3C6.4.2 y 5E11.1.2 reconocen epítomos diferentes a los reconocidos por 5E8.7.4 y 5G8.2.2, puesto que ninguno de los anticuerpos bloqueó la unión de Bio-5E8.7.4 y Bio-5G8.2.2. Además, los anticuerpos 5E8.7.4 y 5G8.2.2 fueron capaces de bloquear sólo su propio anticuerpo monoclonal biotinilado, pero no otros. En consecuencia, de entre los cuatro anticuerpos monoclonales ensayados, parece que se detectaron tres epítomos principales sobre APRIL.

EJEMPLO 10

Efectos de la inmunoadhesina de TACI sobre el modelo de artritis en múrido

[0233] Se realizó un ensayo *in vivo* en un modelo en múrido de artritis inducida por colágeno (CIA) para determinar si la inhibición de la interacción de TACI con su ligando o ligandos podía impedir la progresión de la CIA.

[0234] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmune en la cual la membrana sinovial de múltiples articulaciones puede pasar a estar inflamada, conduciendo a la destrucción de los tejidos articulares, incluyendo el hueso y cartílago. El sinovio en la RA puede ser altamente inflamatorio por naturaleza, y se caracteriza típicamente por la infiltración de linfocitos y células mononucleares, la activación de las células T y de las células presentadoras de antígeno (APC), la secreción de inmunoglobulina (Ig) de células B, y la producción de citocinas

proinflamatorias [Potocnik *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 31:213 (1990); Wernick *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 28:742 (1985); Ridley *et al.*, *Br. J. Rheumatology*, 29:84 (1990); Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 152:2613 (1994); Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 156:3074 (1996)]. El sinovio inflamado crónicamente está usualmente acompañado por una infiltración masiva de células T CD4 [Pitzalis *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 18:1397 (1988); Morimoto *et al.*, *Am. J. Med.*, 84:817 (1988)].

[0235] La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal para la RA humana, el cual se parece a la enfermedad humana, y puede ser inducido en cepas de ratones susceptibles mediante la inmunización con colágeno del tipo-II (CII) [Courtenay *et al.*, *Nature*, 283:665 (1980); Cathcart *et al.*, *Lab. Invest.*, 54:26 (1986)]. Para desarrollar la CIA se requieren tanto las células T CD4 como los anticuerpos contra el CII. La transferencia de anti-CII a animales ingenuos sólo conduce a una histopatología parcial que es bastante diferente de la CIA, y no se desarrollan los síntomas completos de la CIA [Holmdahl *et al.*, *Agents Action*, 19:295 (1986)]. Por contra, la transferencia adoptiva de ambos, las células T CD4 y los anticuerpos anti-CII de ratones inmunizados con CII, a un receptor nativo reconstituye completamente los síntomas de la CIA clásica [Seki *et al.*, *J. Immunol.*, 148:3093 (1992)]. La implicación de ambas, las células T y los anticuerpos en CIA es consistente también con los hallazgos histopatológicos de las articulaciones inflamadas en la CIA. Por tanto, los agentes que bloquean las funciones de las células B o células T, o inhiben las citocinas proinflamatorias inducidas por las células T, podrían ser eficaces para prevenir o tratar la artritis. Más aún, el vaciado de células T CD4, el bloqueo de las interacciones CD40-CD40L, la neutralización del TNF-alfa o el bloqueo de los receptores de IL-1, todo puede conducir a la prevención de la CIA en ratones [Maini *et al.*, *Immunol. Rev.*, 144:195 (1995); Joosten *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 39:797 (1996); Durie *et al.*, *Science*, 261:1328 (1993)].

[0236] En el estudio de los solicitantes, dos grupos de ratones (ratones DBA/1, machos, de 7 a 8 semanas de edad, Jackson Laboratory) se inmunizaron intradérmicamente con 100 µg de colágeno bovino del tipo-II (BCII) (Sigma Chemical Co.) emulsionado en adyuvante de Freund (CFA) (Difco). Los ratones se desafiaron de nuevo con BCII en adyuvante de Freund incompleto 21 días más tarde. Se desarrolló en los animales una enfermedad espectacular, con los signos clínicos de la artritis, que progresó a una forma más severa con el tiempo. Empezando el día 24, un grupo de ratones se inyectó con 100 µg de TACI-Fc tres veces por semana intraperitonealmente durante seis semanas (N = 9), y un segundo grupo recibió 100 µg de IgG de ratón como control (N = 10). La construcción TACI-Fc se preparó usando cebadores basados en la secuencia de TACI humana (descrita en la presente) para amplificar el ADNc de TACI de ratón a partir de una biblioteca de bazo de ratón. Se clonó un producto de la PCR de aproximadamente 0,45 kb. Subsiguientemente se aisló, a partir de la misma biblioteca, un clon de ADNc que contenía el marco de lectura abierta completo del TACI de ratón (número de acceso de GenBank AF257673). El TACI-Fc de murino se construyó clonando el dominio extracelular de TACI de ratón (aminoácidos 2-129) entre una secuencia señal pro-tripsina y una secuencia IgG1-Fc de ratón, y se preparó la inmunoadhesina tal como se describe en los ejemplos anteriores. A continuación se monitorizaron los animales en busca de signos clínicos de artritis, y al final del estudio, tal como se describe más abajo, se realizó un examen radiológico e histopatológico.

[0237] Los ratones se examinaron diariamente en busca de signos de inflamación articular y se puntuaron como sigue: 0, normal; 1, eritema y tumefacción leve confinados a la articulación del tobillo; 2, eritema y tumefacción leve extendiéndose desde el tobillo hacia las articulaciones metatarsiana/metacarpiana; 3, eritema y tumefacción moderada extendiéndose desde el tobillo hacia las articulaciones metatarsofalángicas/metacarpofalángicas; 4, eritema y tumefacción severa extendiéndose desde el tobillos hacia los dedos. La puntuación artrítica máxima por pies es 4, y la puntuación máxima de la enfermedad por ratón es 16; la puntuación artrítica media se calculó a partir de todos los animales en el grupo.

[0238] Para el análisis radiológico al final del estudio, tanto las plantas delanteras como las plantas traseras se radiografiaron usando un Faxitron Imaging System de rayos-X (Faxitron X-ray Corp., Wheeling, Ill.). Se digitalizaron los datos y se prepararon radiografías. A continuación, se examinaron las radiografías en busca de erosión del hueso y tumefacción del tejido blando. Para el análisis histopatológico, se extrajeron las plantas de los ratones, se fijaron en formalina al 10%, se descalcificaron, y se sumergieron en parafina. Se prepararon secciones de la articulación (6-8 µm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina usando procedimientos histoquímicos estándares. La evaluación microscopía de las patas artríticas se realizó a ciegas. Los cambios artríticos en el tobillo, metacarpofalange/metatarsfalange, interfalángica proximal, y las articulaciones se examinaron en busca de erosión del cartílago articular y del hueso subcondral.

[0239] La FIGURA 16A ilustra el curso de la enfermedad en ratones tratados con TACI-Fc (círculos), o ratones control tratados con IgG (recuadros), y los ratones tratados con solución salina (triángulos) Cada punto de dato representa una media ± SD de un total de 9 (para el grupo tratado con TACI-Fc) o 10 (para los grupos control) ratones. Las diferencias entre el grupo tratado con TACI-Fc y cada uno de los otros dos grupos son estadísticamente significativas. Los ratones en el grupo control desarrollaron síntomas clínicos típicos de la artritis, los cuales empezaron aproximadamente hacia el día 30 y progresaron rápidamente a puntuaciones artríticas muy elevadas (FIGURA 16A). Por contra, en los ratones tratados con TACI-Fc, la progresión de la artritis estuvo marcadamente inhibida. FIGURA 16B muestra las puntuaciones de enfermedad individuales de los pies 3 semanas después de la segunda inmunización. Cada punto representa un pie individual. Las diferencias entre el control y los grupos tratados

con TACI-Fc son estadísticamente significativas. Las puntuaciones artríticas en los ratones tratados con TACI-Fc alcanzaron sólo 1,0, y esto sucedió sólo hacia el final del estudio, mientras que en el grupo control, las puntuaciones alcanzaron hasta >7,0. Estos datos demuestran claramente que la interacción de TACI con su ligando o ligandos es importante para el desarrollo de la CIA.

[0240] Para determinar si el tratamiento de los ratones con TACI-Fc tenía efecto alguno sobre la histopatología de las articulaciones, al final del estudio se realizaron exámenes histopatológicos de las patas de los ratones. Al final del estudio (48 días después de la segunda inmunización), se sacrificaron los ratones y se analizó la histología de sus articulaciones del tobillo (tinción con HE).

[0241] En el grupo control, se caracterizó una enfermedad artrítica grave con proliferación sinovial, infiltración masiva de leucocitos, formación de pinnus que resultó en la erosión del cartílago articular y del hueso, tal como se muestra en la articulación interfalángica proximal (FIGURA 17A). La FIGURA 17A muestra una articulación falángica de un ratón control que indica una sinovitis grave, hiperplasia y destrucción del hueso y cartílago. También se observó el espesamiento sinovial, la infiltración de leucocitos, la degeneración del cartílago articular, y la erosión periarticular en la articulación metacarpiana. La FIGURA 17B muestra una articulación falángica de un ratón tratado con TACI-Fc, sin signos de sinovitis o patología de la enfermedad. En los ratones tratados con TACI-Fc, no hubo evidencia de síntomas histopatológicos, indicando que el TACI-Fc no sólo bloquea los síntomas clínicos de la CIA, sino que también inhibe los síntomas histopatológicos (FIGURAS 17C,D). FIGURA 17C muestra un metacarpo de un ratón control que tiene la patología de la enfermedad con signos masivos de sinovitis, y la FIGURA 17D muestra una articulación metacarpiana de un ratón tratado con TACI-Fc sin ninguna patología.

[0242] Al final del estudio, las patas anteriores y posteriores de los animales se radiografiaron y analizaron en busca de estructuras óseas, tal como se ha descrito más arriba. En el grupo control, los signos de destrucción masiva del hueso y la desfiguración fueron evidentes, mientras que en los ratones tratados con TACI-Fc no se observaron signos significativos de pérdida de hueso o desfiguración (FIGURAS 17E,F). La FIGURA 17E muestra una radiografía de un ratón control mostrando signos de destrucción masiva del hueso y desfiguración. La FIGURA 17F muestra una radiografía de un ratón tratado con TACI-Fc que no muestra signos significativos de pérdida de masiva o desfiguración. Cuando las radiografías de los ratones tratados con TACI-Fc se compararon con las de ratones ingenuos; no se revelaron diferencias aparentes, indicando que el tratamiento protegía completamente los ratones del daño óseo a al cartílago.

[0243] Puesto que se cree que los anticuerpos anti-colágeno juegan un papel importante en el desarrollo de la artritis, también se analizaron las muestras de suero de los ratones para determinar si el tratamiento TACI-Fc de los ratones resultaba en la inhibición de una respuesta inmunitaria humoral anti-colágeno. Para ensayar las respuestas inmunitarias humorales, se sangraron los ratones de forma retroorbital 14 días (FIGURA 18A) y 45 días (FIGURA 18B) después de la segunda inmunización, y se analizó la presencia de anticuerpos anti-colágeno.

[0244] Los niveles en suero de los isotipos IgG1 e IgG2 de anti-BCII se midieron mediante un ELISA usando colágeno BCII como antígeno. De forma resumida, se recubrieron placas de microvaloración con 10 µg/ml de CII bovino nativo, se bloquearon y se incubaron con sueros de ensayo diluidos en serie. Se detectó la IgG unida mediante incubación con anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Pharmingen), seguida por sustrato (dinitrofenilfosfato). Las densidades ópticas se midieron a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices).

[0245] Los resultados se muestran en la FIGURA 18. Cada punto de dato representa una media ± SD de cinco ratones en cada grupo. Los sueros de los ratones en el grupo control mostraron la presencia de niveles elevados de IgG1 e IgG2 anti-colágeno, mientras que en el grupo tratado con TACI-Fc, se observó una considerable inhibición tanto de IgG1 como de IgG2 en los días 14 y 47 después de la segunda inmunización. (FIGURAS 18A,B). La FIGURA 18A muestra los niveles de IgG1 e IgG2a anticógeno 14 días después de la segunda inmunización, y la FIGURA 18B muestra los niveles de IgG1 e IgG2a anticógeno 47 días después de la segunda inmunización (barras en blanco, ratones tratados con BSA; barras en negro, ratones tratados con TACI-Fc). Estos resultados sugieren que el tratamiento con TACI-Fc podría adaptar el desarrollo de la CIA, al menos parcialmente, mediante el bloqueo de los anticuerpos anti-colágeno.

[0246] Puesto que tanto las células T como las B específicas del colágeno pueden iniciar la CIA, se realizó un ensayo adicional para examinar si la prevención de la CIA mediado por TACI-Fc estaba asociada también con la inhibición de las funciones efectoras de la célula T. Se recolectaron los nódulos linfáticos y los bazoos procedentes de ratones control y tratados con TACI-Fc al final del estudio, y se examinó las respuestas de recuerdo *in vitro* de las células T contra el colágeno y la producción de citocinas efectoras. Se sacrificaron ratones inmunizados con BCII 47 días después de la segunda inmunización, y se recolectaron sus nódulos linfáticos inguinales y bazoos. Se prepararon suspensiones de célula única, y las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/ml (200 µl/well) en DMEM que contenía un 5% de FCS inactivado por calor, glutamina 2 mM, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, y 2×10^{-5} M 2-ME. Las células se cultivaron en medio solo, o en presencia de varias concentraciones de BCII. Para ensayar la proliferación de linfocitos (FIGURA 18C), las células de nódulo linfático (1×10^6 células por pocillo) se cultivaron primero durante 72 horas, seguidas por la adición de 1 µCi de [3 H]-

timidina (International Chemical and Nuclear, Irvine, Calif.) durante las 18 últimas horas de un cultivo de 5 días, y se ensayó la incorporación de radiactividad mediante recuento de las escintilaciones en líquido (representado como c.p.m.) usando un contador de placa β Wallac.

5 **[0247]** Las respuestas frente al colágeno de las células T proliferantes procedente de ratones tratados con TACI-Fc fue casi inapreciable en comparación con las de los ratones control (FIGURA 18C; recuadros, ratones control; círculos, ratones tratados con TACI-Fc).

[0248] Para los ensayos de citocinas, las células de nódulo linfático y esplénicas se cultivaron en 0,2 ml de medio con o sin BCII; 1×10^6 células/ml (200 μ l/pocillo) se cultivaron en el medio arriba mencionado, solas o en presencia de BCII. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas para ensayar la secreción de IL-2, y 72 horas después para ensayar la producción de IFN-gamma, las cuales se halló que eran los tiempos de incubación óptimos para la determinación de las citocinas, y se almacenaron a -20°C hasta analizarlos. Los niveles de IL-2 e IFN-gamma se detectaron mediante ELISA usando un equipo procedente de Pharmingen (San Deigo, Calif.). Las curvas estándares se generaron usando IL-2 e IFN-gamma recombinantes de ratón. Cuando se midió la producción de IL-2 e IFN-gamma por parte de las células T procedentes de estos ratones, el grupo tratado con TACI-Fc (mostrado en las FIGURAS 18D y 18E mediante círculos) mostró muy poca producción de estas citocinas, mientras que las células T procedentes del grupo control (mostrado en las FIGURAS 18D y 18E mediante recuadros) secretaron niveles significativos tanto de IL-2 como de IFN-gamma (FIGURA 18D (producción de IL-2), 18E (producción de IFN-gamma)).

[0249] Estos datos sugieren que el tratamiento con TACI-Fc de los ratones no tan sólo inhibió la producción de anticuerpo anti-colágeno, sino que también reguló funciones de las células T efectoras. Por tanto, se cree que las interacciones de TACI con su(s) ligando(s) son importantes también en las respuestas inmunitarias mediadas por células T.

[0250] Puesto que se ha mostrado también que el receptor TACI se expresa sobre las células T y está implicado en la activación de las NF-AT asociadas con la activación de las células T [von Bulow *et al.*, *Science*, 278:138 (1997)], se cree que el bloqueo de la interacción de TACI con su ligando o ligandos podría perjudicar directamente la activación de las células T y sus funciones efectoras que son necesarias, por ejemplo, para la progresión de la CIA en los ratones.

[0251] Para determinar el papel directo de TACI en la activación de las células T, se realizó un ensayo *in vitro* de la activación específica para el antígeno de células T. Se examinó *in vitro* la activación de las células T por el anticuerpo anti-CD3 en presencia de TACI-Fc midiendo la proliferación y producción de IL-2 por parte de estas células T. Se cultivaron células esplénicas procedentes de ratones C57BL/6 adultos (Jackson Laboratory) (1×10^6 por pocillo) en varias concentraciones de $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen) con o sin diferentes concentraciones de TACI-Fc en el medio, tal como se ha descrito más arriba. La proliferación se midió mediante la captación de ^3H -timidina como se ha explicado más arriba. También se prepararon ensayos paralelos para medir los efectos de TACI-Fc sobre la producción de IL-2 inducida por el anticuerpo anti-CD3 en un sistema de cultivo de 24 horas, como se ha mencionado más arriba. Se usó un ELISA para determinar los niveles de IL-2 en los sobrenadantes, usando anticuerpos procedentes de Pharmingen, y usando sus protocolos recomendados. Para estudiar los efectos de TACI-Fc sobre la estimulación *in vitro* de las células transgénicas TCR, se cultivaron 1×10^6 células procedentes de ratones transgénicos MBP-TCR adultos (criados a partir de un par de animales de cría obtenidos del Dr. Richard Flavell, Howard Hughes Medical Institute, Yale University) en presencia de $10 \mu\text{g/ml}$ MBP-Ac1-11 (un péptido sintético NH2-terminal de la Proteína Básica de Mielina, que tiene la secuencia de aminoácidos ASQKRPSQRSK (SEC. N° ID.:10) con el primer aminoácido acetilado), con o sin diferentes concentraciones de TACI-Fc en placas de 96 pocillos, en medio DMEM suplementado con un 5% FCS, glutamina 2 mM, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycin. La proliferación se midió mediante la adición de 1 μCi de [^3H]-timidina (International Chemical and Nuclear, Irvine, Calif.) durante las 18 últimas horas de un cultivo de 5 días, y la incorporación de radiactividad se ensayó mediante recuento de escintilaciones en líquido.

[0252] La FIGURA 19A muestra la inhibición por TACI-Fc de la proliferación de células T ingenuas, inducida por el anticuerpo anti-CD3, de forma dependiente de la dosis, mientras que la FIGURA 19B muestra la inhibición de la producción de IL-2 por parte de células T nativas inducida por el anticuerpo anti-CD3, según se ve afectada por TACI-Fc de forma dependiente de la dosis. (En las FIGURAS 19A y 19B, el tratamiento con TACI-Fc se muestra mediante círculos; los controles se muestran mediante recuadros).

[0253] También se examinó la activación *in vitro* de las células T transgénicas TCR de la Proteína Básica de Mielina (MBP) en presencia de TACI-Fc midiendo la proliferación y producción de IL-2 por parte de estas células T (tal como se ha descrito más arriba). De nuevo, TACI-Fc inhibió tanto la proliferación como la producción de IL-2 por parte de células T transgénicas MBP-TCR de manera dependiente de la dosis (no se muestran los datos). Estos resultados demuestran que el receptor TACI está implicado en la activación de las células T, y que esta función puede bloquearse con TACI-Fc.

EJEMPLO 11**Efectos de la inmunoadhesina de TACI sobre el modelo de EAE en múrido**

5 **[0254]** El modelo en múrido de EAE se ha descrito en la literatura como un modelo para la esclerosis múltiple humana [Grewal *et al.*, *Science*, 273:1864-1867 (1996).

[0255] En el estudio de los solicitantes, se inmunizaron subcutáneamente dos grupos de 10 ratones cada uno (ratones transgénicos MBP-TCR machos y hembras de 10 a 15 semanas de edad (descritos en el EJEMPLO 10) con 10 µg de MBP Acl-11 (descrita en el EJEMPLO 10 anterior) en 100 µl de adyuvante de Freund completo (CFA) (Difco). A continuación de la inmunización inicial con Acl-11, se inyectaron intraperitonealmente en cada ratón 200 ng de toxina de Pertussis (List Biologicals, Campbell, Calif.) en 100 µl de solución salina, a las 24 y 48 horas. Empezando el día 2 hasta el día 24, un grupo de ratones se inyectó con 100 µg de TACI-Fc (descrito en el EJEMPLO 10) en 100 µl de solución salina estéril, intraperitonealmente, a diario, y un segundo grupo recibí 100 µg de IgG de múrido en 100 µl de solución salina estéril, intraperitonealmente, a diario. Los animales se monitorizaron entonces diariamente en busca del inicio de la enfermedad. Los signos clínicos de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) se verificaron diariamente y se asignó una puntuación del 1 al 5 a cada ratón en base a el sistema de índices de EAE establecido: 0 = apariencia normal; 1 = cola cada; 2 = andares anormales; 3 = debilidad de las extremidades; 4 = parálisis que implica una extremidad (parálisis parcial de la extremidad posterior); 5 = parálisis que implica dos extremidades (parálisis de la extremidad posterior total). Este es un sistema de puntuación modificado respecto el descrito previamente en Grewal *et al.*, *Science*, 273:1864-1867 (1996).

[0256] Los resultados se muestran en la FIGURA 20. Los datos mostrados en la FIGURA 20 indican que los animales que recibn la IgG de control desarrollaron los síntomas clínicos esperados de la EAE; la aparición de la enfermedad en los ratones tratados control empezó el día 5 y alcanzó los niveles de pico en 10 días. Por contra, los ratones tratados con TACI-Ig no desarrollaron formas graves de los síntomas de la EAE. La puntuación de la enfermedad fue mucho más baja que en el grupo control, alcanzando solamente puntuaciones clínicas de 2 (que no progresaron a puntuaciones más elevadas durante el estudio). Los resultados sugieren que el tratamiento con TACI-Ig protegió los ratones de desarrollar una EAE patente.

Depósito de material

[0257] Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA (ATCC):

Material	n de depósito con ATCC	Fecha de depósito
3C6.4.2	PTA-1347	15 de febrero de 2000
5E11.1.2	PTA-1346	15 de febrero de 2000
5G8.2.2	PTA-1345	15 de febrero de 2000
5E8.7.4	PTA-1344	15 de febrero de 2000

[0258] Este depósito de hace bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y las Regulaciones bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público a partir de la concesn de la pertinente patente estadounidense o a partir de la exposición al público de cualquier solicitud de patente estadounidense o de país extranjero, cualquiera que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks como con derecho a la misma de acuerdo con los artículos 35 y 112 de la USC y las normas del Commissioner en relación a lo mismo (incluyendo el 37 CFR '1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

[0259] El cesionario de la presente solicitud ha aceptado que, si un cultivo de los materiales en depósito muriese o se perdiera o fuera destruido cuando se cultiva en condiciones apropiadas, los materiales serán remplazados con prontitud, a partir de la notificación, con otros del mismo tipo. La disponibilidad del material de depósito no debe considerarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

[0260] La descripción escrita anterior se considera que es suficiente para permitir que un experto en la materia lleve a cabo la presente invención. La presente invención no se limitará en su alcance por los ejemplos presentados en la presente invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y 5 descritas en la presente invención, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

Listado de secuencias

[0261]

10

<110> GENENTECH, INC.

<120> USOS DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL TNF

15

<130> P1805R1 PCT

<141> 2000-11-28

20 <150> US 60/182.938

<151> 2000-02-16

<150> US 60/226.986

<151> 2000-08-22

25

<160> 14

<210> 1

<211> 1377

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<400> 1

35

```

agcatcctga gtaatgagtg gcctggggccg gagcaggcga ggtggccgga 50
gccgtgtgga ccaggaggag cgctttccac agggcctgtg gacgggggtg 100
gctatgagat cctgccccga agagcagtac tgggatcctc tgctgggtac 150
ctgcatgtcc tgcaaaacca tttgcaacca tcagagccag cgcacctgtg 200
cagccttctg caggtcactc agctgccgca aggagcaagg caagttctat 250
gaccatctcc tgagggactg catcagctgt gcctccatct gtggacagca 300
ccctaagcaa tgtgcatact tctgtgagaa caagctcagg agcccagtga 350
accttccacc agagctcagg agacagcgga gtggagaagt tgaaaacaat 400
tcagacaact cgggaaggta ccaaggattg gagcacagag gctcagaagc 450
aagtccagct ctcccggggc tgaagctgag tgcagatcag gtggccctgg 500
tctacagcac gctggggctc tgccctgtgtg ccgtcctctg ctgcttctctg 550
gtggcggtgg cctgcttcct caagaagagg ggggatccct gctcctgcca 600
gccccgctca aggccccgtc aaagtccggc caagtcttcc caggatcacg 650
cgatggaagc cggcagccct gtgagcacat cccccgagcc agtggagacc 700
tgcagcttct gcttccctga gtgcagggcg cccacgcagg agagcgcagt 750
cacgcctggg acccccgacc ccacttgtgc tggaagggtg gggtgccaca 800
ccaggaccac agtcctgcag ccttgcccac acatcccaga cagtggcctt 850
ggcattgtgt gtgtgcctgc ccaggagggg ggcccaggtg cataaatggg 900
ggtcaggggag ggaaaggagg agggagagag atggagagga ggggagagag 950

```

aaagagaggt ggggagaagg gagagagata tgaggagaga gagacagagg 1000
 aggcagaaaag ggagagaaac agaggagaca gagagggaga gagagacaga 1050
 5 gggagagaga gacagagggg aagagaggca gagagggaaa gaggcagaga 1100
 aggaaagaga caggcagaga aggagagagg cagagagggg gagaggcaga 1150
 10 gagggagaga ggcagagaga cagagagggg gagagggaca gagagagata 1200
 gagcaggagg tcggggcact ctgagtccca gttcccagtg cagctgtagg 1250
 15 tcgtcatcac ctaaccacac gtgcaataaa gtcctcgtgc ctgctgctca 1300
 cagccccga gagccccctc tcctggagaa taaaaccttt ggcagctgcc 1350
 20 cttcctcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1377

<210> 2

25 <211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

30

	Met	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Gly	Gly	Arg	Ser	Arg	Val	
	1				5					10					15	
35	Asp	Gln	Glu	Glu	Arg	Phe	Pro	Gln	Gly	Leu	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	
					20					25					30	
	Met	Arg	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Gln	Tyr	Trp	Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	
					35					40					45	
40	Thr	Cys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ile	Cys	Asn	His	Gln	Ser	Gln	Arg	
					50					55					60	
	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Lys	Glu	Gln	
45					65					70					75	
	Gly	Lys	Phe	Tyr	Asp	His	Leu	Leu	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Ala	
					80					85					90	
	Ser	Ile	Cys	Gly	Gln	His	Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Tyr	Phe	Cys	Glu	
50					95					100					105	
	Asn	Lys	Leu	Arg	Ser	Pro	Val	Asn	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Arg	Arg	
					110					115					120	
55	Gln	Arg	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Arg	
					125					130					135	

	Tyr	Gln	Gly	Leu	Glu	His	Arg	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu
					140					145					150
5	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser
					155					160					165
10	Thr	Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Cys	Phe	Leu	Val
					170					175					180
15	Ala	Val	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Asp	Pro	Cys	Ser	Cys
					185					190					195
	Gln	Pro	Arg	Ser	Arg	Pro	Arg	Gln	Ser	Pro	Ala	Lys	Ser	Ser	Gln
					200					205					210
20	Asp	His	Ala	Met	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Glu
					215					220					225
25	Pro	Val	Glu	Thr	Cys	Ser	Phe	Cys	Phe	Pro	Glu	Cys	Arg	Ala	Pro
					230					235					240
30	Thr	Gln	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Cys
					245					250					255
	Ala	Gly	Arg	Trp	Gly	Cys	His	Thr	Arg	Thr	Thr	Val	Leu	Gln	Pro
					260					265					270
35	Cys	Pro	His	Ile	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	Ile	Val	Cys	Val	Pro
					275					280					285
40	Ala	Gln	Glu	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala							
					290										

<210> 3

45 <211> 995

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

50

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatcettacg 50
 5 tgcgcggaag acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag 100
 ttcattgttc tcaacattct agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt 150
 10 cttgtagaga tattacttgt ccttcagggc tgttctttct gtagctccct 200
 tgttttcttt ttgtgatcat gttgcagatg gctgggcagt gctcccaaaa 250
 15 tgaatatttt gacagtttgc tgcctgcttg cataccttgc caacttcgat 300
 gttcttctaa tactectect ctaacatgtc agcgttattg taatgcaagt 350
 20 gtgaccaatt cagtgaaggg aacgaatgcg attctctgga cctgtttggg 400
 actgagctta ataatttctt tggcagtttt cgtgctaattg tttttgctaa 450
 25 ggaagataag ctctgaacca ttaaaggacg agtttaaaaa cacaggatca 500
 ggtctcctgg gcatggctaa cattgacctg gaaaagagca ggactgggtga 550
 30 tgaaattatt ctccgagag gcctcgagta cacgggtggaa gaatgcacct 600
 gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga ccattgcttt 650
 35 ccactcccag ctatggagga aggcgcaacc attcttgcga ccacgaaaac 700
 gaatgactat tgcaagagcc tgccagctgc tttgactgct acggagatag 750
 40 agaaatcaat ttctgctagg taattaacca ttctgactcg agcagtgcc 800
 ctttaaaaat cttttgtcag aatagatgat gtgtcagatc tctttaggat 850
 45 gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt ttgtctctt aactgtggaa 900
 50 actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg agcttaattgg 950
 tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga 995

55

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

60 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

55 <210> 5
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

atggatgact ccacagaaag ggagcagtca cgccttactt cttgccttaa 50
 5 gaaaagagaa gaaatgaaac tgaaggagtg tgtttccatc ctcccacgga 100
 aggaaagccc ctctgtccga tcttccaaag acggaaagct gctggctgca 150
 10 accttgctgc tggcactgct gtcttgctgc ctcacgggtg tgtctttcta 200
 ccaggtggcc gccctgcaag gggacctggc cagcctccgg gcagagctgc 250
 15 agggccacca cgcggagaag ctgccagcag gagcaggagc cccaaggcc 300
 ggcttgaggg aagctccagc tgtcaccgcg ggactgaaaa tctttgaacc 350
 20 accagctcca ggagaaggca actccagtca gaacagcaga aataagcgtg 400
 25 ccgttcaggg tccagaagaa acagtcactc aagactgctt gcaactgatt 450
 gcagacagtg aaacaccaac tatacaaaaa ggatcttaca catttgttcc 500
 30 atggcttctc agctttaaaa ggggaagtgc cctagaagaa aaagagaata 550
 aatattggt caaagaaact ggttactttt ttatatatgg tcaggtttta 600
 35 tatactgata agacctacgc catgggacat ctaattcaga ggaagaagggt 650
 ccatgtcttt ggggatgaat tgagtctggg gactttgttt cgatgtattc 700
 40 aaaatatgcc tgaaacacta cccaataatt cctgctattc agctggcatt 750
 45 gcaaaactgg aagaaggaga tgaactccaa cttgcaatac caagagaaaa 800
 tgcacaaata tcactggatg gagatgtcac attttttggg gcattgaaac 850
 50 tgctgtga 858

<210> 6

<211> 285

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 6

5	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Gln	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Cys
	1				5					10					15
10	Leu	Lys	Lys	Arg	Glu	Glu	Met	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Val	Ser	Ile
					20					25					30
15	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Pro	Ser	Val	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Gly
					35					40					45
	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Cys
					50					55					60
20	Leu	Thr	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Asp
					65					70					75
25	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	His	His	Ala	Glu	Lys
					80					85					90
30	Leu	Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala
					95					100					105
35	Pro	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile	Phe	Glu	Pro	Pro	Ala	Pro
					110					115					120
	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Ala	Val
					125					130					135
40	Gln	Gly	Pro	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Leu	Ile
					140					145					150

45

5	Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe	155	160	165
10	Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu	170	175	180
15	Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile	185	190	195
20	Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His	200	205	210
25	Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser	215	220	225
30	Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu	230	235	240
35	Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu	245	250	255
40	Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile	260	265	270
45	Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu	275	280	285

40 <210> 7
 <211> 1348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 7

```

ggtagcaggc ttcctagagg gactggaacc taattctcct gaggctgagg 50
gagggtggag ggtctcaagg caacgctggc cccacgacgg agtgccagga 100
gcactaacag tacccttagc ttgctttcct cctccctcct ttttatatttc 150
aagttccttt ttatttctcc ttgcgtaaca accttcttcc cttctgcacc 200
actgcccgta cccttaccgg ccccgccacc tccttgctac cccactcttg 250
aaaccacagc tgttggcagg gtccccagct catgccagcc tcattctcct 300

```

tcttgctagc ccccaaaggg cctccaggca acatgggggg cccagtcaga 350
gagccggcac tctcagttgc cctctggttg agttgggggg cagctctggg 400
ggccgtggct tgtgccatgg ctctgctgac ccaacaaaca gagctgcaga 450
gcctcaggag agaggtgagc cggctgcagg ggacaggagg cccctcccag 500
aatggggaag ggtatccctg gcagagtctc ccggagcaga gttccgatgc 550
cctggaagcc tgggagaatg gggagagatc ccggaaaagg agagcagtcg 600
tcacccaaaa acagaagaag cagcactctg tcctgcacct ggttcccatt 650
aacgccacct ccaaggatga ctccgatgtg acagaggtga tgtggcaacc 700
agctcttagg cgtgggagag gcctacaggc ccaaggatat ggtgtccgaa 750
tccaggatgc tggagtttat ctgctgtata gccaggtcct gtttcaagac 800
gtgactttca ccatgggtca ggtggtgtct cgagaaggcc aaggaaaggca 850
ggagactcta ttccgatgta taagaagtat gccctcccac ccggaccggg 900
cctacaacag ctgctatagc gcagggtgtct tccatttaca ccaaggggat 950
atcttgagtg tcateattcc ccgggcaagg gcgaaactta acctctctcc 1000
acatggaacc ttcttggggt ttgtgaaact gtgattgtgt tataaaaagt 1050
ggctcccagc ttggaagacc aggggtgggt cactactggag acagccaaga 1100
gctcagctata taaaggagag ggaatgtgca ggaacagagg catcttccctg 1150
ggtttggctc ccggttccct acttttccct tttcattccc accccctaga 1200
ctttgatatt acggatatct tgcttctgtt ccccatggag ctccgaattc 1250
ttgcgtgtgt gtagatgagg ggcgggggac ggcgccagg cattgttcag 1300
acctggtcgg ggcccactgg aagcatccag aacagcacca ccatctta 1348

<210> 8

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9

<211> 265

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

	Gln	Pro	Arg	Ser	Arg	Pro	Arg	Gln	Ser	Pro	Ala	Lys	Ser	Ser	Gln
					200					205					210
5	Asp	His	Ala	Met	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Glu
					215					220					225
	Pro	Val	Glu	Thr	Cys	Ser	Phe	Cys	Phe	Pro	Glu	Cys	Arg	Ala	Pro
					230					235					240
10	Thr	Gln	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Cys
					245					250					255
	Ala	Gly	Arg	Thr	Ala	Pro	Pro	Arg	Glu	Gly					
15					260					265					

20
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <400> 10

	Ala	Ser	Gln	Lys	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Lys
	1				5					10	

30
 <210> 11
 <211> 1377
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 11

```

tttttttttt tttttttttt gaggaagggc agctgccaaa ggttttattc 50
tccaggagga ggggctctcg ggggctgtga gcagcaggca cgaggacttt 100
attgcacgtg tggtaggtg atgacgacct acagctgcac tgggaactgg 150
gactcagagt gccccgacct cctgctctat ctctctctgt ccctctctcc 200
ctctctgtct ctctgcctct ctccctctct gctctctctcc ctctctgcct 250
ctctccttct ctgcctgtct ctttcttct ctgcctcttt ccctctctgc 300
ctctcttccc ctctgtctct ctctccctct gtctctctct ccctctctgt 350
ctcctctggt tctctccctt tctgcctcct ctgtctctct ctctcatat 400
ctctctcccc tctccccacc tctctttctc tctccccctc tctccatctc 450
tctccctcct ctttccctc cctgaccccc atttatgcac ctgggcccc 500
ctcctgggca ggcacacaca caatgccaaag gccactgtct gggatgtgtg 550
ggcaaggctg caggactgtg gtctggtgt ggcacccccca ccttcagca 600
caagtggggt cgggggtccc aggcgtgact gcgtctcct gcgtgggcgc 650
cctgcactca ggaagcaga agctgcaggc ctccactggc tcgggggatg 700
tgctcacagg gctgccggct tccatcgct gatcctggga agacttggcc 750
ggactttgac ggggccttga gcggggctgg caggagcagg gatccccct 800
cttcttgagg aagcaggcca ccgccaccag gaagcagcag aggacggcac 850
acaggcagag cccagcgtg ctgtagacca gggccacctg atctgactc 900
agcttcagcc ccgggagagc tggacttgct tctgagcctc tgtgctccaa 950
tccttggtac cttcccgagt tgtctgaatt gttttcaact tctccactcc 1000
gctgtctcct gagctctggt ggaagggtca ctgggctcct gagcttggtc 1050
tcacagaagt atgcacattg cttaggggtg tgtccacaga tggaggcaca 1100
gctgatgcag tccctcagga gatggtcata gaacttgct tgcctctgc 1150
ggcagctgag tgacctgcag aaggctgcac aggtgcgctg gctctgatgg 1200
ttgcaaactgg ttttgagga catgcaggta cccagcagag gatcccagta 1250

```

ctgctcttcg gggcaggatc tcetagccac ccccgccac aggcctgtg 1300
 5 gaaagcgctc ctctgggtcc acacgggtcc ggccacctcg cctgctccgg 1350
 cccaggccac tcattactca ggatgct 1377

10

<210> 12

<211> 995

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

20 tcaggaaaaa aaaagacttt aatcatgaaa ccaaggaagt ttctaccatt 50
 aagctcccaa cagtaacctc gagaaatata tctaacataa agagtttcca 100
 25 cagttagagg acaaaaagct gtatcggcaa ctgaaaaata cagtcaccc 150
 aaagagatct gacacatcat ctattctgac aaaagatttt taaagtggca 200
 30 ctgctcgagt cgaaatgggt aattacctag cagaaattga tttctctatc 250
 tccgtagcac tcaaagcagc tggcaggctc ttgcaatagt cattegtttt 300
 cgtggtgaca agaatgggtg cgccttcctc catagctggg agtggaaagc 350
 35 aatggtcaga gtcgaccttc ggtttgctct tgatgcagtc ttcacagggtg 400
 cattcttcca ccgtgtactc gaggcctctc ggaagaataa tttcatcacc 450
 40 agtcctgctc ttttccaggt caatgttagc catgcccagg agacctgac 500
 ctgtgttttt aaactcgtcc tttaatgggt cagagcttat cttccttagc 550
 45 aaaaacatta gcacgaaaac tgccaaagaa attattaagc tcagtcccaa 600
 acagggtccag agaatcgcat tcgttccttt cactgaattg gtcacacttg 650
 50 cattacaata acgctgacat gttagaggag gagtattaga agaacatcga 700
 agttgacaag gtatgcaagc atgcaacaaa ctgtcaaaat attcattttg 750
 55 ggagcactgc ccagccatct gcaacatgat cacaaaaaga aaacaagggg 800
 gctacagaaa gaacagcctg gaaggacaag taatatctct acaagaattc 850

60

cagagcaaat gcagcaagag cagctagaat gttgagaaca atgaacttcg 900
 5 cctgcttcgt gggttcttac gggggctgtc tgtgtcttcg cggcacgtaa 950
 ggatttgaat accacatcta attcaagttt ctaagtttga gtctt 995

10
 <210> 13
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 13

tcacagcagt ttcaatgcac caaaaaatgt gacatctcca tccagtgata 50
 20 tttgtgcatt ttctcttggg attgcaagtt ggagttcatc tcttcttcc 100
 agttttgcaa tgccagctga atagcaggaa ttattgggta gtgtttcagg 150
 25 catattttga atacatcgaa acaaagtcac cagactcaat tcctcccca 200
 agacatggac cttcttcctc tgaattagat gtcccatggc gtaggtctta 250
 30 tcagtatata aaacctgacc atatataaaa aagtaaccag tttctttgac 300
 caatatatta ttctcttttt cttctagggc acttcccctt ttaaagctga 350
 35 gaagccatgg aacaaatgtg taagatcctt tttgtatagt tgggtgtttca 400
 ctgtctgcaa tcagttgcaa gcagtcttga gtgactgttt cttctggacc 450
 ctgaacggca cgcttatctc tgctgttctg actggagttg cttctctctg 500
 45 gagctgggtg ttcaaagatt ttcagtcctg cggtgacagc tggagcttcc 550
 tccaagccgg ccttgggggc tctgctcct gctggcagct tctccgctg 600
 50 gtggccctgc agctctgccc ggaggctggc caggctccct tgcagggcgg 650
 ccacctggta gaaagacacc accgtgaggc agcaagacag cagtgccagc 700
 55 agcaaggttg cagccagcag ctttccgtct ttggaggatc ggacagaggg 750
 gctttccttc cgtgggagga tggaaacaca ctcttcagt ttcatttctt 800
 60 ctcttttctt aaggcaagaa gtaaggcgtg actgctcctt ttctgtggag 850
 tcatccat 858

<210> 14

<211> 1348

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

10 taagatggtg gtgctgttct ggatgcttcc agtgggcccc gaccaggtct 50
   gaacaatgcc tggcgcccggt ccccgcccc tcattctacac acacgcaaga 100
   attcggagct ccatgggggaa cagaagcaag atatccgtac aatcaaagtc 150
   tagggggttg gaatgaaaag ggaaaagtga ggaacgggga gccaaaccca 200
   ggaagatgcc tctgttcctg cacattccct ctctttata tactcagctc 250
   ttggctgtct ccagtatgta cccaccctgg tcttccaagc tgggagccac 300
   tttttataac acaatcacag ttccacaaac cccaggaagg ttccatgtgg 350
   agagagotta agtttcgccc ttgccggggg aattatgaca ctccagaatat 400
   ccccttggtg taaatggaag acacctgcgc tatagcagct gttgtaggcc 450
   cgggtccgggt gggagggcat acttcttata catcggaata gagtctcctg 500
   ccttccttgg ccttctcgag acaccacctg acccatgggtg aaagtcacgt 550
   cttgaaacag gacctggcta tacagcagat aaactccagc atcctggatt 600
   cggacaccat atccttgggc ctgtaggcct ctcccacgcc taagagctgg 650
   ctgccacatc acctctgtca catcgagtc atccttggag gtggcgtaa 700
   tgggaaccag gtgcaggaca gagtgtgtct tcttctgttt ttgggtgagc 750

```

actgctctcc ttttcggha tctctccca ttctcccagg ctccagggc 800
atcggaactc tgctccgha gactctgcca gggataccct tccccattct 850
gggaggggccc tcctgtcccc tgcagccggc tcacctctct cctgaggctc 900
tgcagctctg tttgttgggt cagcagagcc atggcacaag ccacggcccc 950
cagagctgcc ccccaactca accagagggc aactgagagt gccggctctc 1000
tgactgggccc ccccatgttg cctggaggcc ctttgggggc tagcaagaaa 1050
ggagatgagg ctggcatgag ctggggaccc tgccaacagc tgtggtttca 1100
agagtggggt agcaaggagg tggcggggcg ggtaagggtta cgggcagtgg 1150
tgcagaaggg aagaagggtg ttacgcaagg agaaataaaa aggaacttga 1200
aaataaaaag gagggaggag gaaagcaagc taagggtact gttagtgctc 1250
ctggcactcc gtcgtggggc cagcgttgcc ttgagaccct ccacctccc 1300
tcagcctcag gagaattagg ttccagtccc tctaggaagc ctcgtacc 1348

REIVINDICACIONES

1. Antagonista del polipéptido APRIL que es un anticuerpo monoclonal anti-APRIL, en el que el polipéptido APRIL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8 o un fragmento de la misma, en el que dicho antagonista de APRIL bloquea, inhibe o neutraliza la unión del polipéptido APRIL al receptor TACI o a ambos receptores TACI y BCMA, para utilizar en un método de tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer, en el que dicha enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren o lupus, o leucemia, linfoma o mieloma.
2. Utilización de un antagonista del polipéptido APRIL que es un anticuerpo monoclonal anti-APRIL, en el que el polipéptido APRIL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8 o un fragmento de la misma, en el que dicho antagonista de APRIL bloquea, inhibe o neutraliza la unión del polipéptido APRIL al receptor TACI o a ambos receptores TACI y BCMA en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer, en el que dicha enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren o lupus, o leucemia, linfoma o mieloma.
3. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar según la reivindicación 1 o la utilización según la reivindicación 2, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
4. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según la reivindicación 3, donde el anticuerpo anti-APRIL es un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia del anticuerpo 3C6.4.2 secretado por el hibridoma depositado con la ATCC con número de acceso PTA-1347 o comprende una secuencia del anticuerpo 5E11.1.2 secretado por el hibridoma depositado con la ATCC con número de acceso PTA-1346.
5. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar según la reivindicación 1 o la utilización según la reivindicación 2, donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 3C6.4.2 depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-1347 o el anticuerpo monoclonal 5E11.1.2 depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-1346.
6. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido APRIL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8, el receptor TACI tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 2, y el receptor BCMA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 4.
7. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica o linfocítica aguda, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin o leucemia mieloide aguda.
8. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antagonista del polipéptido APRIL o el medicamento son para la administración con uno o más agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, anticuerpos o radioterapia.
9. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, y VEGF.
10. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según la reivindicación 9, donde el anticuerpo que se une a CD20 es rituximab.
11. Antagonista del polipéptido APRIL para utilizar o la utilización según la reivindicación 9, donde el anticuerpo que se une a ErbB2 es trastuzumab.
12. Composición que comprende un antagonista del polipéptido APRIL que es un anticuerpo monoclonal anti-APRIL, en la que el polipéptido APRIL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8 o un fragmento de la misma, que bloquea, inhibe o neutraliza la unión del polipéptido APRIL al receptor TACI o a ambos receptores TACI y BCMA y un portador.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
14. Composición según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia del anticuerpo 3C6.4.2 secretado por el hibridoma depositado con la ATCC con el número de acceso PTA-1347 o comprende una secuencia del anticuerpo 5E11.1.2 secretado por el hibridoma depositado con la ATCC con número de acceso PTA-1346.

15. Composición según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 3C6.4.2 depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-1347 o el anticuerpo monoclonal 5E11.1.2 depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-1346.

5 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

17. Antagonista del polipéptido APRIL que es un anticuerpo monoclonal anti-APRIL, en el que el polipéptido APRIL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8 o un fragmento de la misma, que bloquea,
10 inhibe o neutraliza la unión del polipéptido APRIL al receptor TACI o a ambos receptores TACI y BCMA.

18. Método para identificar un antagonista o agonista de la interacción del polipéptido APRIL con el receptor TACI o con ambos receptores TACI y BCMA, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con dicho polipéptido APRIL o un receptor TACI o ambos receptores TACI y BCMA, y detectar la interacción de dichos
15 componentes.

19. Método según la reivindicación 18, en el que el compuesto candidato se une o forma complejos con un polipéptido APRIL o los receptores TACI o BCMA, o, en cualquier caso, interfiere con la interacción de estos polipéptidos con otras proteínas celulares.
20

20. Método in vitro de inhibición o neutralización de una actividad biológica del polipéptido APRIL en una célula de mamífero, que comprende exponer dicha célula a una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-APRIL tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la actividad biológica es (i) la unión del polipéptido APRIL al receptor TACI, o (ii) la unión del polipéptido APRIL a los receptores TACI y BCMA.
25

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el polipéptido APRIL, el receptor TACI o el receptor BCMA son recombinantes.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el polipéptido APRIL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8, el receptor TACI tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 2 y el receptor BCMA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 4.
30

```

1 AGCATCCTGA GTAATGAGTG GCCTGGGCGG GAGCAGGCGA GGTGGCCGGA GCCGTGTGGA CAGGAGGAG CGCTTCCAC AGGGCTGTG GACGGGGTG
TCGTAGGACT CATTACTCAC CGGACCGGCG CTCGTCGCT CCACCGGCT CGGACACCT GTCTCTCTC GCGAAGGTG TCCGGACAC CTGCCCCAC
1 M S G L G R S R R G G R S R V D Q E E R F P Q G L W T G V

101 GCTATGAGT CCTGCCCGA AGAGCAGTAC TGGGATCCTC TGGTGGTAC CTGCATCTCC TGCATAACCA TTTGCAACCA TCAGAGCCAG CGACCTGTG
CGATACTCTA GGACGGGGCT TCTCGTCATG ACCCTAGGAG ACCACCCATG GACGTACAGG ACCTTTTGGT AAACGTTGGT AGTCTCGTC GCGTGGACAC
30 A M R S C P E E Q Y W D P L L G T C M S C K T I C N H Q S Q R T C A

201 CAGCCTTCTG CAGGTCACTC AGTGGCCGA AGGAGCAGG CAACTTCTAT GACCATCTCC TGAGGACTG CATCAGCTGT GCCTCCATCT GTGGACAGCA
GTCCGAAGAC GTCCAGTGAG TCGACGGGCT TCCTCGTCC GTTCAAGATA CTGGTAGAGG ACTCCTGAC GTAGTCGACA CGGAGGTAGA CACCTGTCTG
64 A F C R S L S C R K E Q G K F Y D H L L R D C I S C A S I C G Q H

301 CCTAAGCAA TGTGCATCT TCTGTGAGAA CAAGCTCAGG AGCCAGTGA ACCTTCCACC AGAGCTCAGG AGACAGCGGA GTGGAGAAGT TGAAAACAA
GGGATTCGTT ACACGTATGA AGACACTCTT GTTCGAGTCC TCGGTCACT TGAAGGTGG TCTCGAGTCC TCTTCGCCT CACCTCTTCA ACTTTTGTA
97 P K Q C A Y F C E N K L R S P V N L P P E L R R Q R S G E V E N N

401 TCAGACAAC CCGGAAGGTA CCAAGGATTG GAGCACAGAG GCTCAGAAGC AAGTCCAGCT CTCCCGGGG TGAAGCTGAG TGCAGATCAG GTGGCCCTGG
AGTCTGTGA GCCCTTCCAT GGTTCCTAAC CTCGTCTC CGAGTCTTCG TTCAGGTGGA GAGGGCCCC ACITCGACTC AGTCTAGTC CACCGGGACC
130 S D N S G R Y Q G L E H R G S E A S P A L P G L K L S A D Q V A L V

501 TCTACAGCAC GTGGGGCTC TGCCTGTGTG CCGTCTCTG CTGCTTCTG GTGGGGTGG CCTGCTTCT CAAGAGAGG GGGATCCCT GCTCCTGCCA
AGATGTCTG CGACCCCGAG ACGGACACAC GGCAGGAGAC GACGAGGAC CACCGCCACC CACCGCCACC GTTCTTCTCC CCCTAGGGA CGAGGACGCT
164 Y S T L G L C L C A V L C C F L V A V A C F L K K R G D P C S C Q

601 GCCCCGCTCA AGGCCCCGTC AAGTCCGGC CAAGTCTTCC CAGGATCAG CGATGGAAGC CGGAGCCCT GTGAGCACAT CCCCAGAGCC AGTGGAGACC
CGGGGCGAGT TCCGGGGCAG TTCAGGCGG GTTCAGAGG GTCTAGTGC GTACCTTCG GCGTCGGA CACTCTGTA GGGGCTCGG TCACCTCTGG
197 P R S R P R Q S P A K S S Q D H A M E A G S P V S T S P E P V E T

701 TGCAGTTCT GCTTCCCTGA GTGAGGGG CCGAGGCGG AGAGCGCAGT CAGGCTGG ACCCCGACC CCATTGTGC TGGAGGTGG GGGTGGCACA
ACGTGGAAGA CGAAGGAGT CAGTCCCG CCGTCCGCTC TCTCGCTCA GTGGGAGCC TGGGGCTGG GGTGACACG ACCTTCCACC CCCACGGTGT
230 C S F C F P E C R A P T Q E S A V T P G T P D P T C A G R W G C H T

801 CCAGGACCAC AGTCTCTGAG CCTTGCCCC ACATCCAGA CAGTGGGCTT GGCATTGTGT GTGTGCCTGC CCAGGAGGGG GGCCAGGTG CATAAATGG
GGTCTCTGTG TCAGGAGGTC GGAACGGGTG TGTAGGCTGT GTACCCGAA CCGTAACACA CACAGGAGG GTCTCTCCCC CCGGCTCCAC GTATTACCC
264 R T T V L Q P C P H I P D S G L G I V C V P A Q E G G P G A O

```

FIG. 1A

```

901 GGTGAGGGAG GGAAGGAGG AGGAGAGAG ATGGAGAGGA GGGGAGAGAG AAAGAGAGGT GGGGAGAGGG GAGAGAGATA TGAGGAGAGA GAGACAGAGG
    CCAGTCCCTC CCTTTCCCTCC TCCCTCTCTC TACCTCTCTC CCCCTCTCTC TTTCTCTCTC CCCCTCTCCC CTCTCTCTAT ACTCCTCTCT CTCTGTCTCC

1001 AGGCAGAAAG GGAGAGAAAC AGAGGAGACA GAGAGGAGGA GAGAGAGAGA GGGAGAGGG GACAGAGGCA AGAGAGGAAA GAGGCAGAGA
    TCCGTCTTTC CCTCTCTTTG TCTCCTCTGT CTCTCCCTCT CTCTCTCTCT CCCCTCTCT CTGTCTCCGT TTCTCTCCGT CTCTCCCTTT CTCCGTCTCT

1101 AGGAAGAGA CAGGCAGAGA AGGAGAGAGG CAGAGAGGGA GAGAGGAGGA GAGGAGAGGA GGCAGAGAGA CAGAGAGGGA GAGAGAGATA
    TCCTTTCTCT GTCCGTCTCT TCCCTCTCTC GTCTCTCCCT CTCTCCGTCT CTCCCTCTCT CCGTCTCTCT GTCTCTCCCT CTCTCCCTGT CTCTCTCTAT

1201 GAGCAGGAGG TCGGGGCACT CTGAGTCCCA GTTCCCACTG CAGCTGTAGG TCGTCATCAC CTAACCCACAC GTCAATATAA GTCTCGTGC CTGCTGCTCA
    CTCGTCTCTC AGCCCCGTGA GACTCAGGT CAGGGTCAC GTGACATCC AGCAGTAGTG GATTGGTGTG CAGTTATTT CAGGAGCAGG GACGACGAGT

1301 CAGCCCCCGA GAGCCCCCTCC TCCTGGAGAA TAAACCTTT GGCAGCTGCC CTTCCTCAA AAAAAAAA AAAAAA
    GTCGGGGGCT CTCGGGGGAG AGGACCTCTT ATTTGGAA CCGTCGACGG GAAGAGTTT TTTTTTTTTT TTTTTT

```

FIG. 1B

1 AAGACTCAAA CTTAGAAACT TGAATTAGAT GTGGATTACA AATCCTTAGC TGCCGGGAAG ACACAGACAG CCCCCTGAAG ACCCAGGAA GCAGCGAAG
 TTCTGAGTTT GAATCTTTGA ACTTAATCTA CACCATAAGT TTAGGAATGC ACGGCGCTTC TGCTCTGTC GGGGGCATTC TTGGGTGCTT CGTCCGCTTC

 101 TTCAATTGTT TCAACATTCT AGCTGCTCTT GCTGCAATTG CTCTGGAATT CTGTAGAGA TATTACTTGT CCTTCCAGGC TGTTCTTTCT GTAGTCCCT
 AAGTAAACAG AGTTGTAAGA TCGACGAGAA CGACGTAAAC GAGACCTTAA GAACAICTCT ATATGAACA GGAAGTCCG ACAAGAAGA CATCGAGGGA

 201 TGTCTTCTTT TTGTGATCAT GTTGCAGATG GCTGGCGAGT GCTCCCAAAA TGAATATTTT GACAGTTTGT TGCATGCTTG CATACCTTGT CAACCTCGAT
 ACAAAAGAAA AACACTAGTA CAACGTCTAC CGACCGCTCA CGAGGCTTTT ACTTATATAA CTGTCAACA ACGTACGAAC GTATGGHACA GTTGAAGCTA
 1 Me tLeuGlnMet AlaGlyGlnC ysSerGlnAs nGluTyrPhe AspSerLeuL euHisAlaCy sileProCys GlnLeuArgC
 301 GTTCTTCTAA TACTCCTCCT CTAACATGTC AGCGTTATTG TAATGCAAGT GTGACCAATT CAGTGAAAGG AACGAATGCG ATTCTCTGGA CTGTGTTGGG
 CRAAGAAGAT ATGAGGAGGA GATTGTACAG TCGCAATPAC CACTGGTTAA GTCACCTTCC TTGCTTACGC TAAGAGACCT GGACAAACCC
 29 ysSerSerAs nThrProPro LeuThrCysG l nArgTyrCy sAsnAlaSer ValThrAsnS erVallysG l yThrAsnAla IleLeuTyrP hrCysLeuG l
 401 ACTGAGCTTA ATATTTCTT TGGCAGTTT TGGCTAATG TTTTGTCTAA GGAAGATAAG CTCTGAACCA TTAAGAGGAG AGTTTAAAAA CACAGGATCA
 TGACTCGAAT TATTAAAGAA ACCGTCAAAA GCACGATTAC AAAACAGATT CCTTCTATTC GAGACTTGGT AATTCCTGTC TCAATTTTTT GTGTCTTAGT
 62 yLeuSerLeu IleIleSerL euAlaValPh eValLeuMet PheLeuLeuA rGlysIleSe rSerGluPro LeuLysAspG luPheLysAs nThrGlySer
 501 GGTCTCTCTG GCATGGCTAA CATTGACCTG GAAAGAGCA GGACTGGTGA TGAATTTATT CTTCGGAGAG GCCTCGAGTA CACGGTGGAA GAATGCACCT
 CCAGAGGACC CGTACCGATT GTAACCTGAC CTTTCTCTCT CCGTACCACT ACTTTAATAA GAAGGCTCTC CGGAGCTCAT GTGCCACCTT CTTACGTGGA
 95 GlyLeuLeuG lyMetAlaAs nIleAspLeu GluLysSerA rGThrGlyAs pGluIleIle LeuProArgG lyLeuGluTy rThrValGlu GluCysThrC
 601 GTGAAGACTG CATCAAGAGC AAACCGAAGG TCGACTCTGA CCATTGCTTT CCACTCCCAG CTATGGAGA AGGCGCAACC ATTCTTGTC A CACGAAAAC
 CACTTCTGAC GTAGTTCTCG TTTGGCTTCC AGCTGAGACT GGTAACGAAA GTGAGGGTC GATACCTCTT TCCGGGTGG TAAGAACAGT GGTGCTTTTG
 129 ysGluAspCy sileLysSer LysProLysV alAspSerAs pHisCysPhe ProLeuProA laMetGluG l uGlyAlaThr IleLeuValT hrThrLysTh
 701 GAATGACTAT TGCAAGAGCC TGCCAGCTGC TTTGAGTGT ACGGAGATAG AGAATCAAT TTCTGCTAGG TAATTAACCA TTTCGACTCG AGCAGTGCCA
 CTTACTGATA ACGTCTCGG ACGGTCGACG AAACCTCACG TGCTCTATC TCTTTAGTTA AAGACGATCC ATTAATGGT AAAGCTGAGC TCGTCACGGT
 162 rAsnAspTyr CysLysSerL euProAlaAl aleuSerAla ThrGluLeuG l uLysSerIl eSerAlaArg OC*
 801 CTTTAAAAAT CTTTTGTCAG AATAGATGAT GTGTCAGATC TCTTTAGGAT GACTGTATTT TTCAGTTGCC GATACAGCTT TTTCTCTCTCT AACTGTGGAA
 GAAATTTTGA GAAPACAGTC TTATCTACTA CACAGTCTAG AGAATCTTA CTGACATAAA AAGTCAACGG CTATGTGGA AAACAGGAGA TTGACACCTT
 901 ACTCTTTATG TTAGATATAT TTCTCTAGGT TACTGTTGG AGCTTAATGG TAGAACTTC CTTGGTTTCA TGATTAAGT CTTTTTTTTT CCTGA
 TGAGAAATAC AATCTATATA AAGAGATCCA ATGACAACCC TCGAATTACC ATCTTTGAAG GAACCAAGT ACTAATTCA GAAAAAAGG GGAAT

FIG. 2

```

1 ATGATGACT CCACAGAAG GGAGCAGTCA CGCCTACTT CTGCGCTTAA GAAAGAGAA GAATGAAC TGRAGGAGT TGTTCATC CTCCACGGA
  TACCTACTGA GGTGTCTTTC CCTCGTCAGT GCGGAATGAA GAACGGAAT CTTTCTCTT CTTTACTTG ACTTCCTCAC ACAAGGTAG GAGGTGCCT
1 M D D S T E R E Q S R L T S C L K K R E E M K L K E C V S I L P R K

101 AGAAAGCCC CTCTGTCCGA TCCTCCAAG ACGGAAGCT GCTGGTGCA ACCTTGCTG ACCTTGCTG GTCTTGCTG CTCACGGTG TGTCTTTCTA
  TCCTTTCGG GAGACAGGCT AGGAGGTTTC TGCCTTTGGA CGACCGAGCT TGAACGACG ACGTGACGA CAGAACGAC GAGTGCCACC ACAGAAAGAT
35 E S P S V R S S K D G K L L A A T L L L A L L S C C L T V V S F Y

201 CCAGGTGGC GCCTCGAAG GGGACCTGGC CAGCTCCGG GCACAGCTGC AGGCCACCA CGCGAGNAG CTGCCAGCAG GAGCAGGAGC CCCCAGGCC
  GGTCCACCG CGGACGTTT CCTGGACCG GTCTGACG CGTCTGACG TCCCGTGGT GCGCTCTTC GACGGTGTG CTCGTCTCTG GGGTTCGGG
68 Q V A A L Q G D L A S L R A E L Q G H H A E K L P A G A G A P K A

301 GGCTTGAGG AAGCTCCAGC TGTACCCGG GGAAGTAAA TCCTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAAGCA ACTCCAGTCA GAACGACGA AATAAGCGTG
  CGAACCTCC TTCGAGTCC ACAGTGGCG CCTGACTTTT AGAAGCTTGG TGGTCGAGT CCTCTCCGT TGAGGTCACT CTTGTCTCT TTATTCGCAC
101 G L E E A P A V T A G L K I F E P P A P G E G N S S Q N S R N K R A

401 CCGTTCAGG TCCAGAAGAA ACAGTCATC AAGCTGCTT GCACTGCTT GCACTGCTT TATACAAA GGATCTTACA CATTGTCTC
  GGCAAGTCCC AGGTCTTCTT TGTACGTAG TTCTGACGAA CGTTGACTAA CGTCTGTAC TTTGTGTTG ATATGTTTT CCTAGATGT GTAAACAAGG
135 V Q G P E E T V T Q D C L Q L I A D S E T P T I Q K G S Y T F V P

501 ATGGCTTCT AGCTTTAAA GGGGAAGTC CCTAGAAGAA AAAGAGAATA AATATTGGT CAAGAAACT GGTACTTTT TTATATATGG TCAGTTTAA
  TACCGAAGAG TCGAATTTT CCCCTTCAG GATCTTCTT TTTCTCTAT TTTATAACCA GTTCTTTGA CCAATGAAA AATATATACC AGTCCAAAAT
168 W L L S F K R G S A L E E K E N K I L V K E T G Y F F I Y G Q V L

601 TATACGTATA AGACCTACG CATGGGACAT CTATTCAGA GGAAGAAGT CCAATGCTTT CCAATGCTTT TGAAGTCTGT GACTTTGTT CGATGTATTC
  ATATGACTAT TCTGGATCG GTACCTCTGA GATTAAGTCT CCTTCTTCCA GTTACAGAA CCCCTACTTA ACTCAGACCA CTGAACAAA GCTACATAAG
201 Y T D K T Y A M G H L I Q R K K V H V F G D E L S L V T L F R C I Q

701 AATATATGCC TGAACACTA CCCAATANT CCTGCTATTC AGCTGGCATT GCAAACTGG AAGAAGGAGA TGAATCCAA CTGCAATAC CAAGAGAAA
  TTTTATACGG ACTTTGTGAT GGGTTATTAA GGACGATAAG TCGACCGTAA CGTTTGACC TTCTTCTCT ACTTGAGGT GAACGTTATG GTTCTCTTT
235 N M P E T L P N N S C Y S A G I A K L E E G D E L Q L A I P R E N

801 TGCACAAATA TCACGTGATG GAGATGTCAC ATTTTGTGT GATTTGAAC TGCTGTGA
  ACGTGTATT AGTGACCTAC CTCTACAGT TAAACACCA CGTAACCTTG ACGACACT
268 A Q I S L D G D V T F F G A L K L L O

```

FIG. 3

1 GGTACGAGGC TTCCTAGAGG GACTGGAAACC TAATTCTCCT GAGGCTGAGG GAGGTGGAG GGTCTCAGG CACGCTGGC CCCACGACGG AGTGCCAGGA
 CCATGCTCCG AAGGATCTCC CTGACCTGG ATTAAGAGGA CTCGACTCC CTCGCCACTC CCAGAGTTCC GGTGCTGCC GGTGCTGCC TCACGGTCTT

 101 GCACTAACAG TACCCCTTAGC TTGCTTTCTT CCTCCCTCCT TTTTATTTTC AAGTTCCTTT TTATTTCTCC TTGGCTAACA ACCTTCTTCC CTTCTGACCC
 CGTGATGTC ATGGGAATCG AARGAAAGGA GGAGGAGGA AAATAAAGG TTACAGGAA AATAAGAGG AACGATTTGT TGGAAAGAGG GAAGACGTGG

 201 ACTGCCCGTA CCTTACCAG CCCCGCCACC TCCTTGCTAC CCCACTCTTG AACCCACAGC TGTGGCAGG GTCCCGAGCT CATGCCAGCC TCATCTCTT
 TGACGGGCAT GGGATGGGC GGGCGGTGG AGGAACGATG GGTGAGAAC TTTGTGTGCG AACACCGTCC CAGGGTCTGA M P A S S P F
 1

 301 TCTTGCTAGC CCCAAAGGG CCTCCAGGCA ACATGGGGGG CCACGTGAGA GAGCCGGCAC TCTCAGTTGC CCTCTGTTG AGTTGGGGG CAGCTCTGGG
 ARAAGATCG GGGGTTTCCC GGAGGTCCGT TGTACCCCCC GGTCAGTCT CTCGGCCGTG AGAGTCAAG GGAGACCAAC TCACCCCCC GTCGAGACCC
 8 L L A P K G P P G N M G G P V R E P A L S V A L W L S W G A A L G

 401 GGCCGTGGCT TGTGCCATGG CTCTGCTGAC CCAACAACA GAGTGCAGA GCCTCAGGAG AGAGGTGAGC CGGCTGCAGG GGACAGGAGG CCCCTCCCAG
 CCGGCACCGA ACACGGTACC GAGACGACTG GGTGTTTGT CTCGACGCTC CGGAGTCTTC TCTCCACTCG GCCGACGTC CCTGTCTTCC GGGGAGGCTC
 41 A V A C A M A L L T Q Q T E L Q S L R R E V S R L Q G T G G P S Q

 501 AATGGGAGG GGTATCCCTG GCAGATCTC CCGAGACAGA GTTCCGATGC CCTGGAGCC TGGGAGATG GGGAGAGATC CCGGAAAGG AGACAGTGC
 TTACCCCTTC CCATAGGAC CGTCTCAGAG GGCTCTGCT CAAGCTCTCG GACCTTCGG ACCCTCTTAC CCTCTCTAG GGCTTTTCC TCTGCTCAG
 74 N G E G Y P W Q S L P E Q S S D A L E A W E N G E R S R K R R A V L

 601 TCACCCAAA ACAGAAGAG CAGCACTCTG TCCTGCACCT GGTTCACCTT AAGCCACCT CCAAGATGA CTCGATGTG ACAGAGTGA TGTGSCAAC
 AGTGGGTTTT TGTCTTCTC GTCGTGAGAC AGGACGTGGA CCAAGGTAA TTGCGGTGA GGTTCCTACT GAGCTACAC TGTCTCCTAC ACACCGTTGG
 108 T Q K Q K K Q H S V L H L V P I N A T S K D D S D V T E V M W Q P

 701 AGCTCTTAGG CGTGGGAGG GCCTACAGG CCAAGGATAT GGTGTCGAA TCACAGATGC TGGAGTTAT CTGCTGTATA GCCAGGTCCT GTTCAAGAC
 TCGAGAATCC GCACCTCTC CGGATGTCG GGTTCCTATA CCACAGGCTT AGGTCCTACG ACCTCAATA GACACATAT CGGTCCAGGA CAAAGTTCTG
 141 A L R R G R G L Q A Q G Y G V R I Q D A G V Y L L Y S Q V L F Q D

 801 GTGACTTTCA CCATGGTCA GGTGTGTCT CGAGAGGCC AARGAGGCA GGAGACTCTA TTCGATGTA TAAGAGTAT GCCTCCAC CCAGACCGG
 CACTGAAAGT GTACCCAGT CCACCACAGA GCTCTTCCG TTCTTCCCTT CCTCTGAGAT AAGGCTACAT ATTCTTCATA CCGGAGGGTG GGCTGGGCC
 174 V T F T M G Q V V S R E G Q G R Q E T L F R C I R S M P S H P D R A

 901 CCTACACAG CTGCTATAGC GCAGGTGTCT TCCATTACA CCAAGGGAT ATTCTGAGTG TCATAATTCC CCGGGCAGG GCGAACTTA ACCTCTCTCC
 GGATGTTGTC GACGATATCG CGTCCACAGA AGGTAAATGT GTTCCCTCTA TAAGACTCAC AGTATTAGG GGCCCTTCC CGCTTTGAAT TGGAGAGAGG
 208 Y N S C Y S A G V F H L H Q G D I L S V I I P R A R A K L N L S P

FIG. 4A

```

1001 ACATGGAACC TTCCTGGGT TTGTGAACT GTGATTGTGT TATAAAAGT GGCTCCAGC TTGGAAGACC AGGGTGGTA CATACTGGAG ACAGCCAAGA
    TGTACCTTGG AAGGACCCCA AACACTTGA CACTAACACA ATATTTTCA CCGAGGTCG AACCTTCTGG TCCCACCCAT GTATGACCTC TGTCGGTTCT
241 H G T F L G F V K L O
1101 GCTGAGTATA TAAAGGAGAG GGAATGTGCA GGAACAGAGG CATCTTCCTG GGTITGGCTC CCGTTCTCTC ACTTTTCCCT TTTCATTCCC ACCCCCTAGA
    CGACTCATAT ATTTCCTCTC CCTTACACGT CCTTGTCTCC GTAGAAGGAC CCAACCCGAG GGGCAAGGAG TGAAGAAGGA AAAGTAAGGG TGGGGGATCT
1201 CTTGATTTT ACGGATATCT TGCTTCTGTT CCCCATGGAG CTCGGAATTC TTGCGTGTGT GTAGATGAGG GGGGGGGGAC GGGGGCCAGG CATTTGTTCAG
    GAACTAAA TGCCTATAGA ACGAAGACAA GGGGTACCTC GAGGCTTAAG AACGCACACA CATCTACTCC CCGCCCCCTG CCGCGGGTCC GTAACAAGTC
1301 ACCTGGTCGG GGCCCACTGG AAGCATCCAG AACAGCACCA CCATCTTA
    TGGACCAGCC CCGGGTGACC TTCGTAGGTC TTGTCGTGGT GGTAGAAT

```

FIG. 4B

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos aminoácidos idénticamente emparejados entre las dos secuencias polipeptídicas según es determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 15 = 33,3%

FIG. 5A

PRO	XXXXXXXXXXXX	Longitud = 10 aminoácidos
Proteína de comparación	XXXXXXYYYYYYZZYZ	Longitud = 15 aminoácidos

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos aminoácidos idénticamente emparejados entre las dos secuencias polipeptídicas según es determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 10 = 50%

FIG. 5B

htACI(265) htACI	10	20	30	40	50
	M S G L G R S R R G G R S R V D Q E E R F P Q G L W T G V A M R S C P E E Q Y W D P L L G T C M S C				
	M S G L G R S R R G G R S R V D Q E E R F P Q G L W T G V A M R S C P E E Q Y W D P L L G T C M S C				
htACI(265) htACI	60	70	80	90	100
	K T I C N H Q S Q R T C A A F C R S L S C R K E Q G K F Y D H L L R D C I S C A S I C G Q H P K Q C				
	K T I C N H Q S Q R T C A A F C R S L S C R K E Q G K F Y D H L L R D C I S C A S I C G Q H P K Q C				
htACI(265) htACI	110	120	130	140	150
	A Y F C E N K L R S P V N L P P E L R R Q R S G E V E N N S D N S G R Y Q G L E H R G S E A S P A L				
	A Y F C E N K L R S P V N L P P E L R R Q R S G E V E N N S D N S G R Y Q G L E H R G S E A S P A L				
htACI(265) htACI	160	170	180	190	200
	P G L K L S A D Q V A L V Y S T L G L C L C A V L C C F L V A V A C F L K K R G D P C S C Q P R S R				
	P G L K L S A D Q V A L V Y S T L G L C L C A V L C C F L V A V A C F L K K R G D P C S C Q P R S R				
htACI(265) htACI	210	220	230	240	250
	P R Q S P A K S S Q D H A M E A G S P V S T S P E P V E T C S F C F P E C R A P T Q E S A V T P G T				
	P R Q S P A K S S Q D H A M E A G S P V S T S P E P V E T C S F C F P E C R A P T Q E S A V T P G T				
htACI(265) htACI	260	270	280	290	300
	P D P T C A G R T - - - - - - - - - - - - - - - A P P R E G - - - - - Z				
	P D P T C A G R W G C H T R T T V L Q P C P H I P D S G L G I V C V P A Q E G P G A Z				

FIG. 6

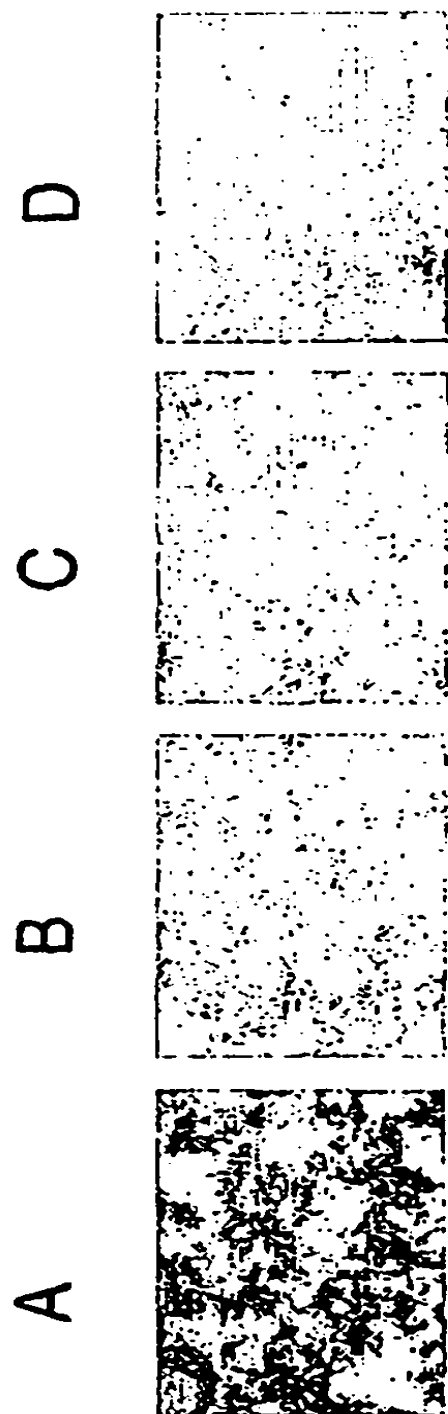


FIG. 7

FIG. 8A

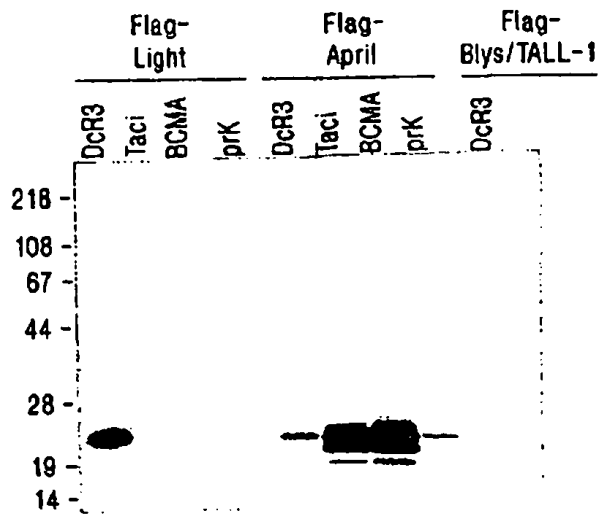
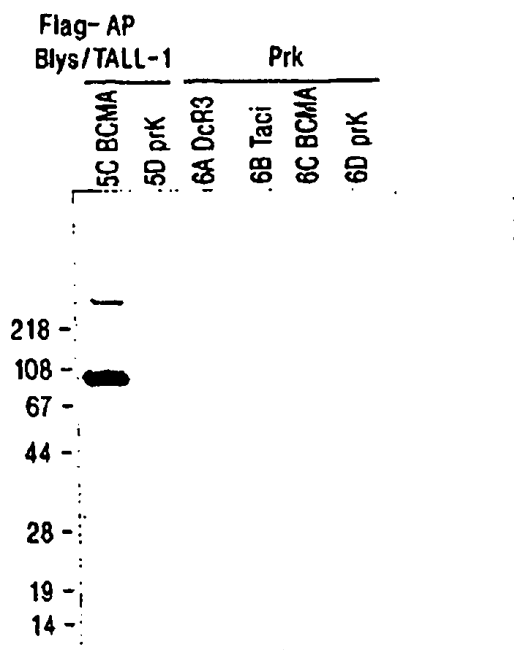
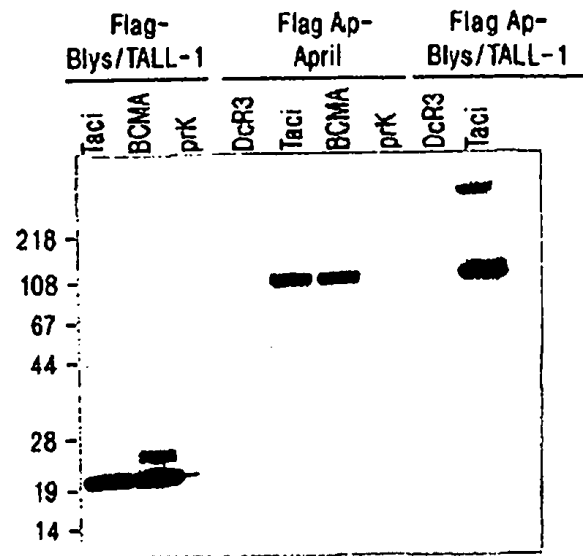


FIG. 8B



Ip: con Proteína A
WB con α Flag HR

FIG. 8C

FIG. 8D

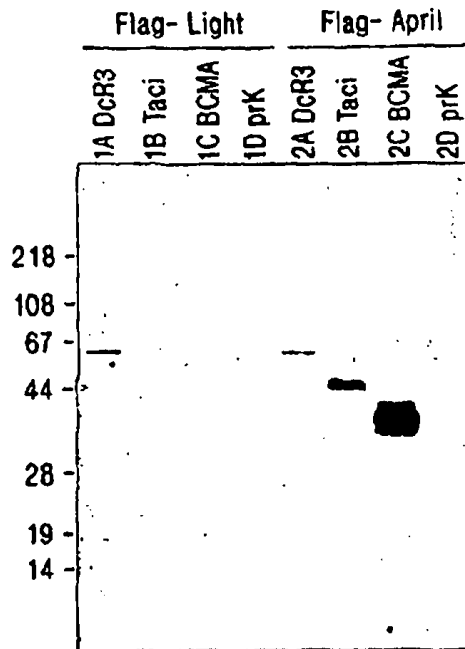
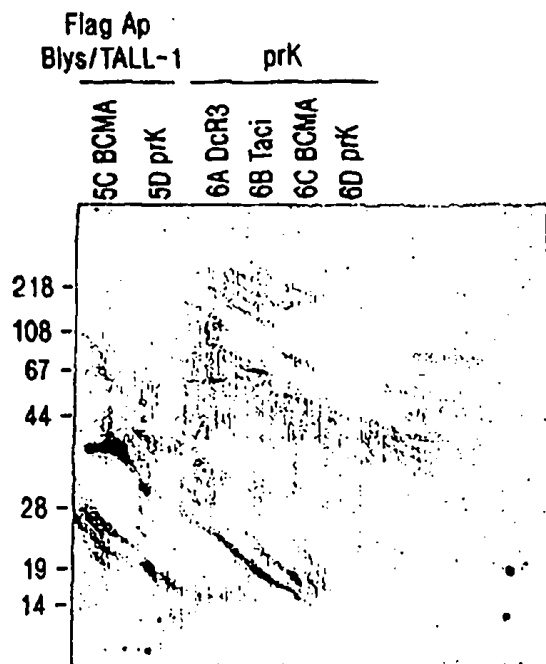
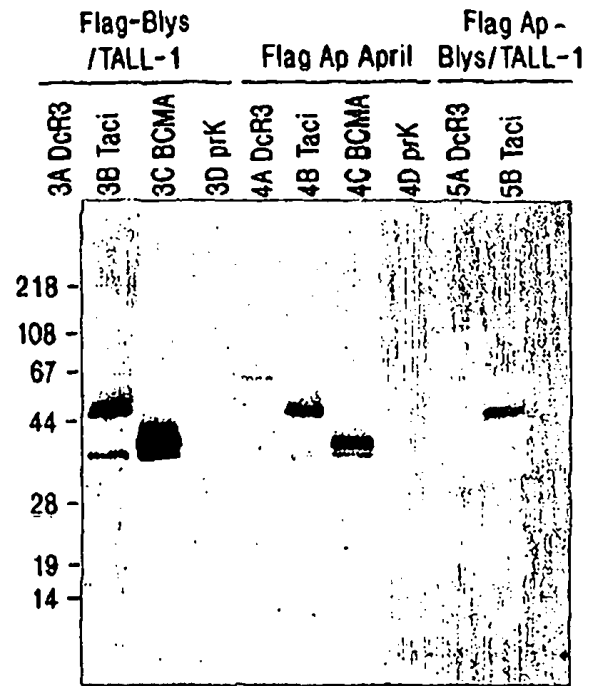


FIG. 8E



Ip: con
 α Flag
 WB: con
 α HuIgG. HRP

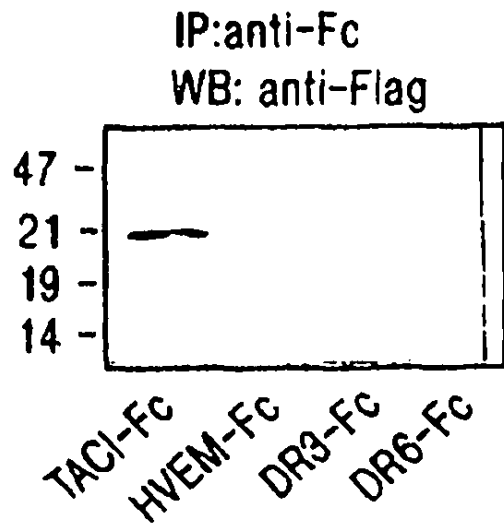


FIG. 8G

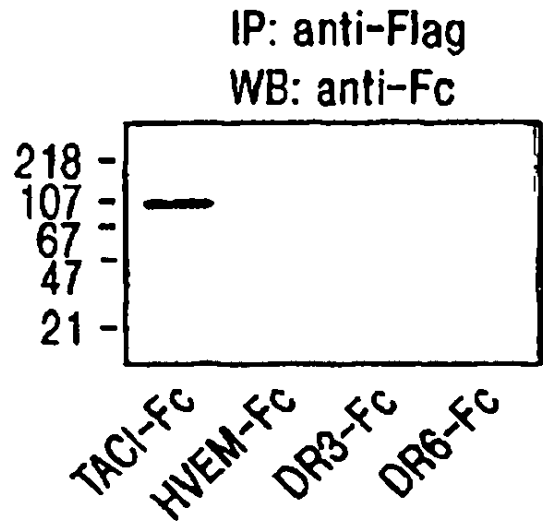


FIG. 8H

FIG. 9A

Blys/
TALL-1

April

TNF α

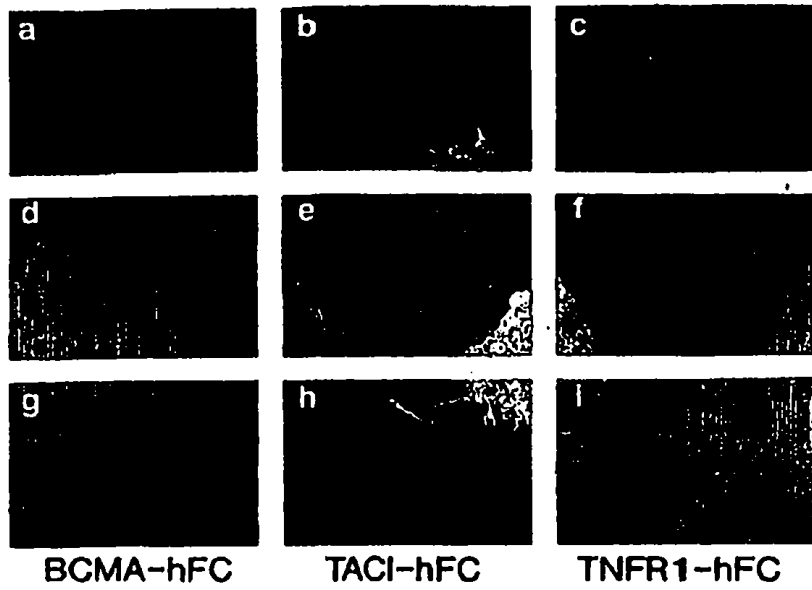
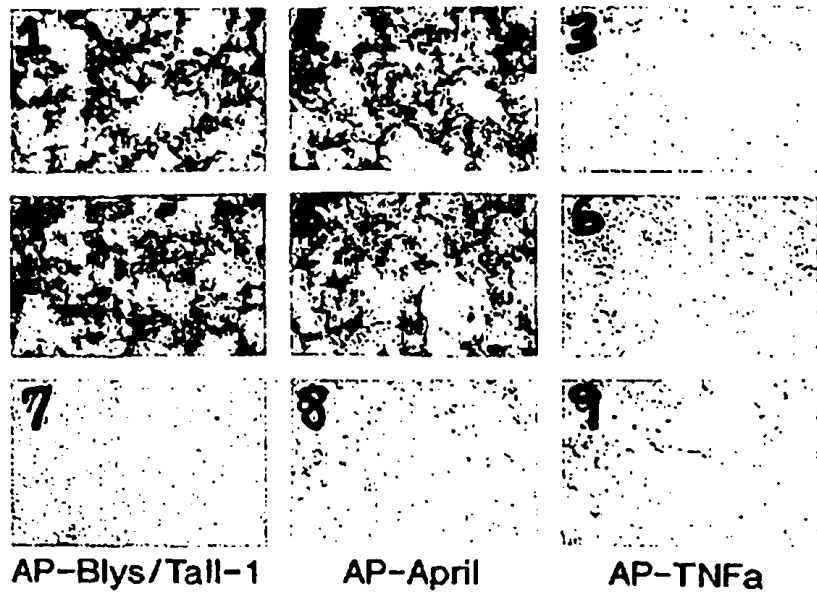


FIG. 9B

TACI

BCMA

Vector



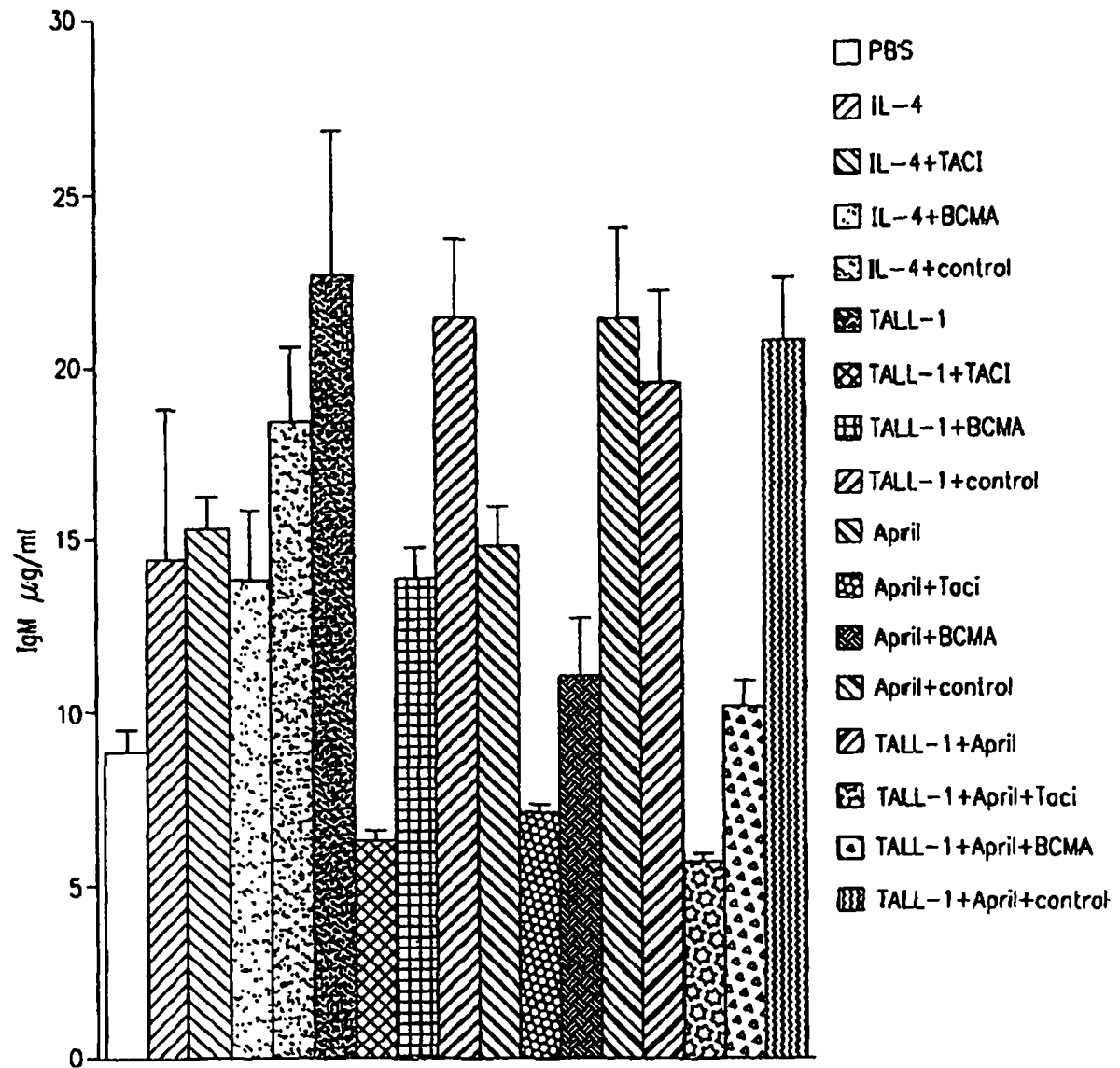


FIG. 10

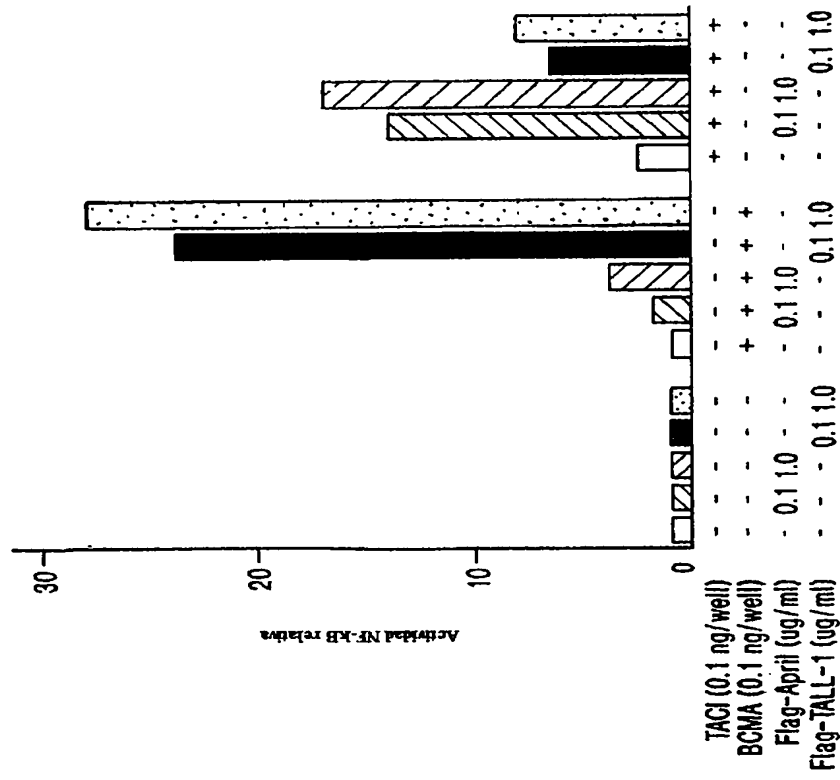


FIG. 11A

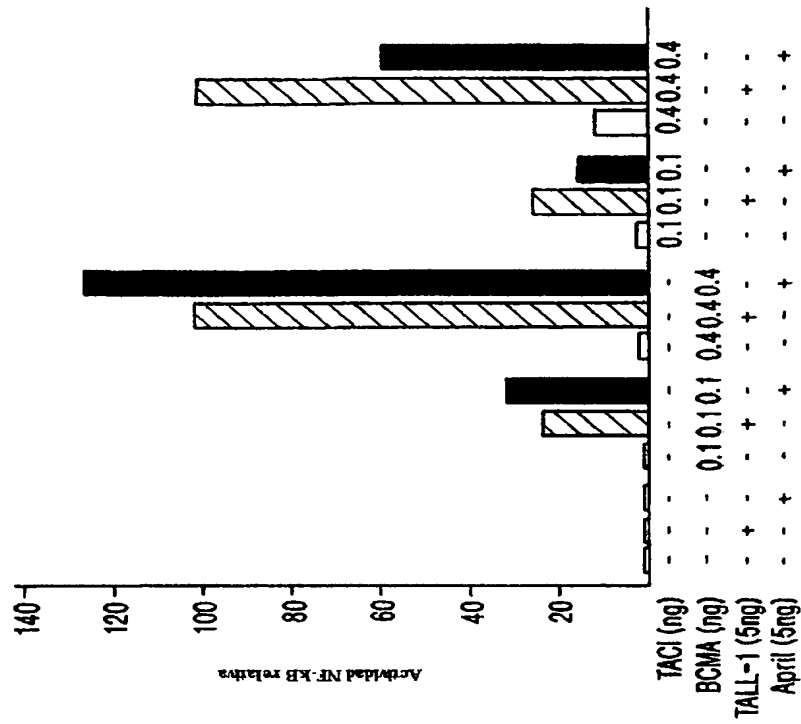


FIG. 11B

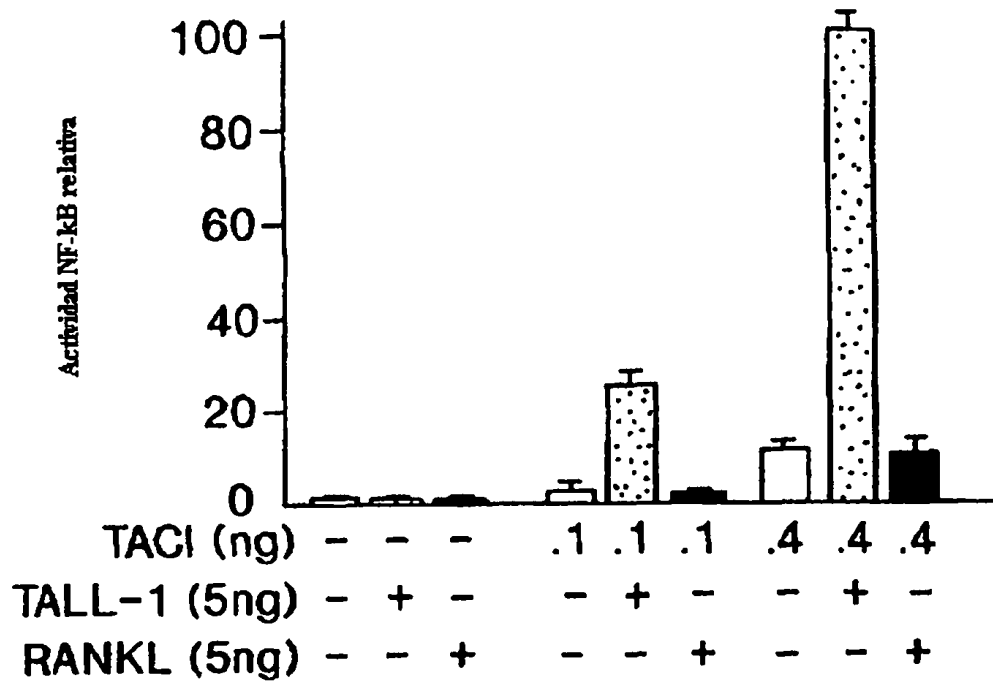


FIG. 11C



FIG. 11D

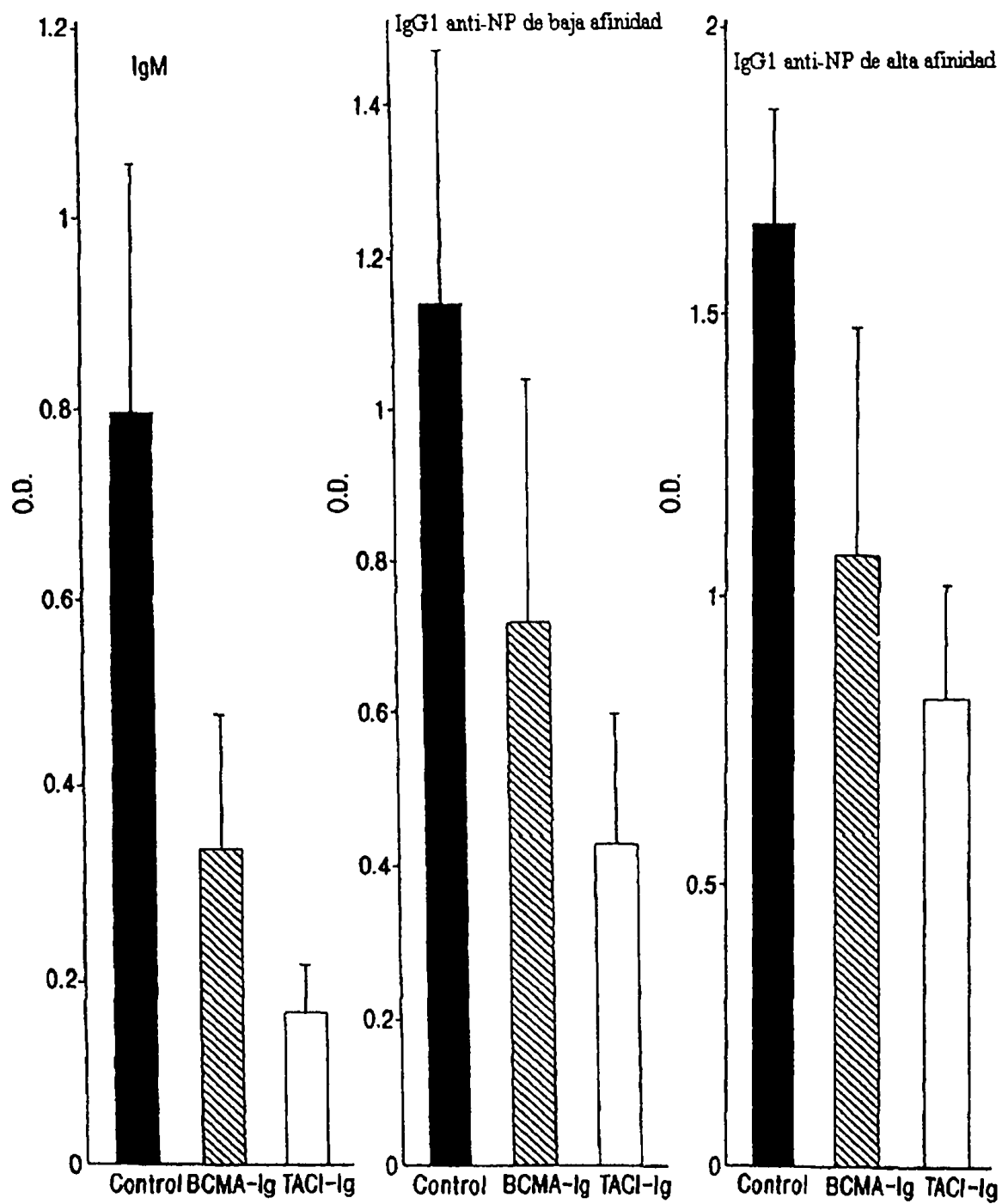


FIG. 12A

FIG. 12B

FIG. 12C

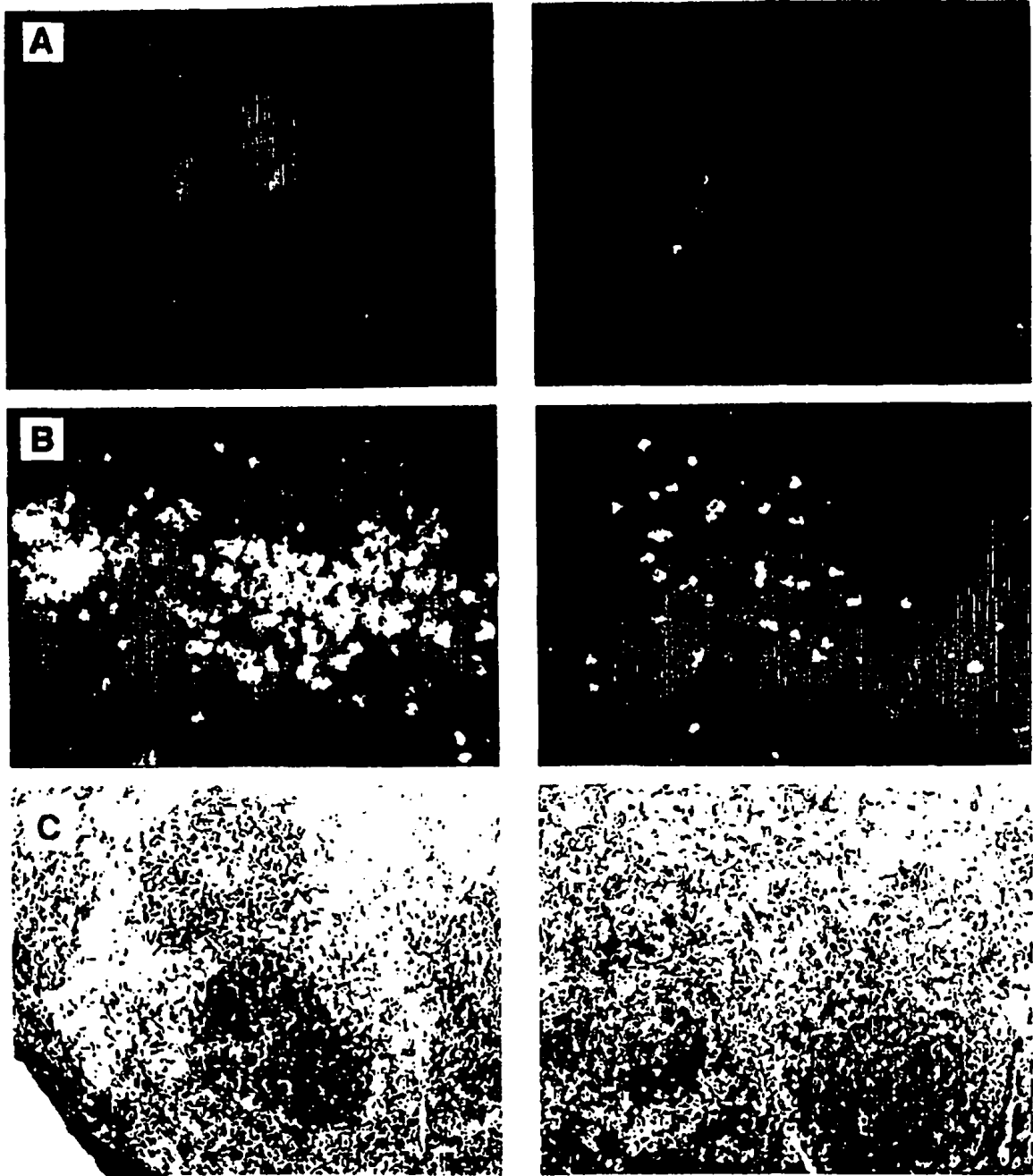


FIG. 13-1

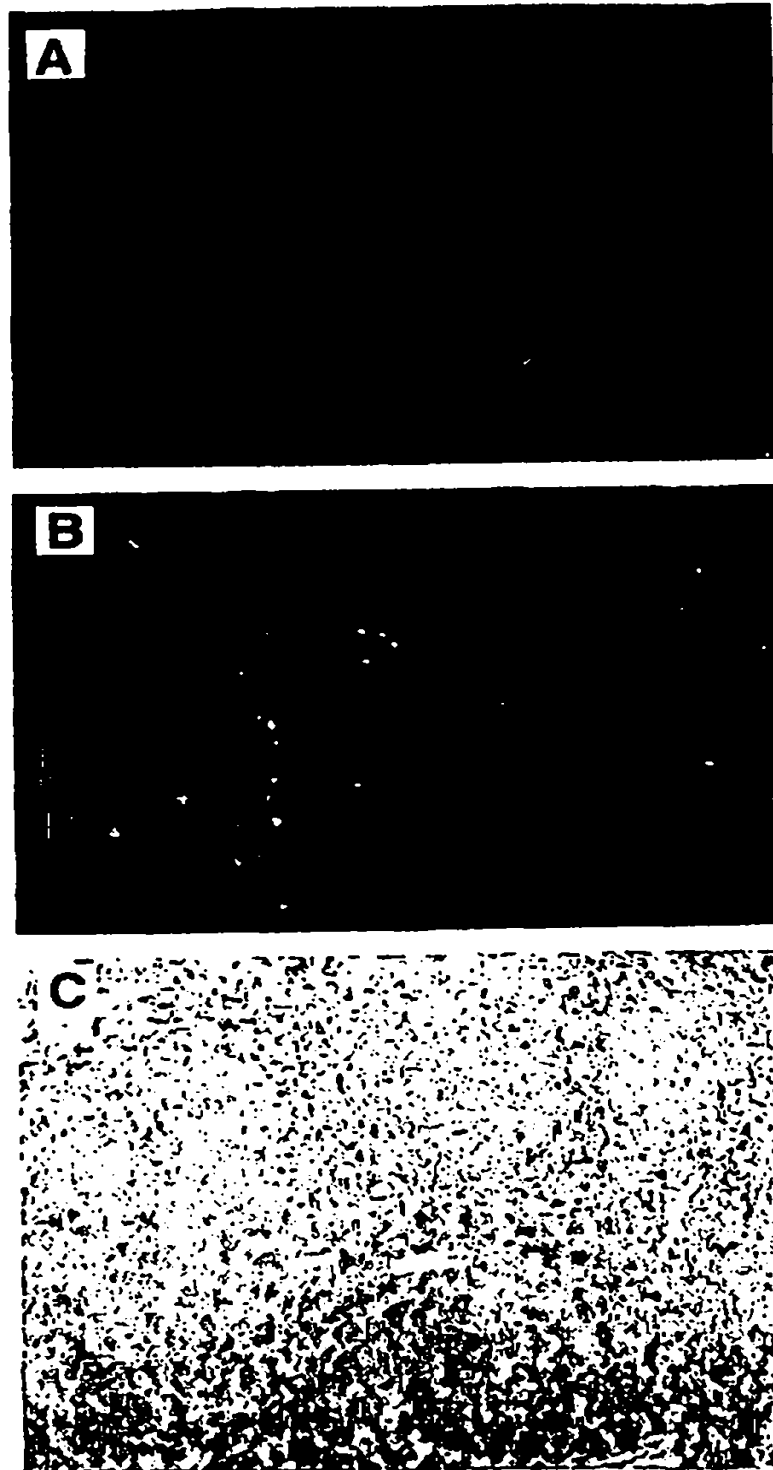


FIG. 13-2

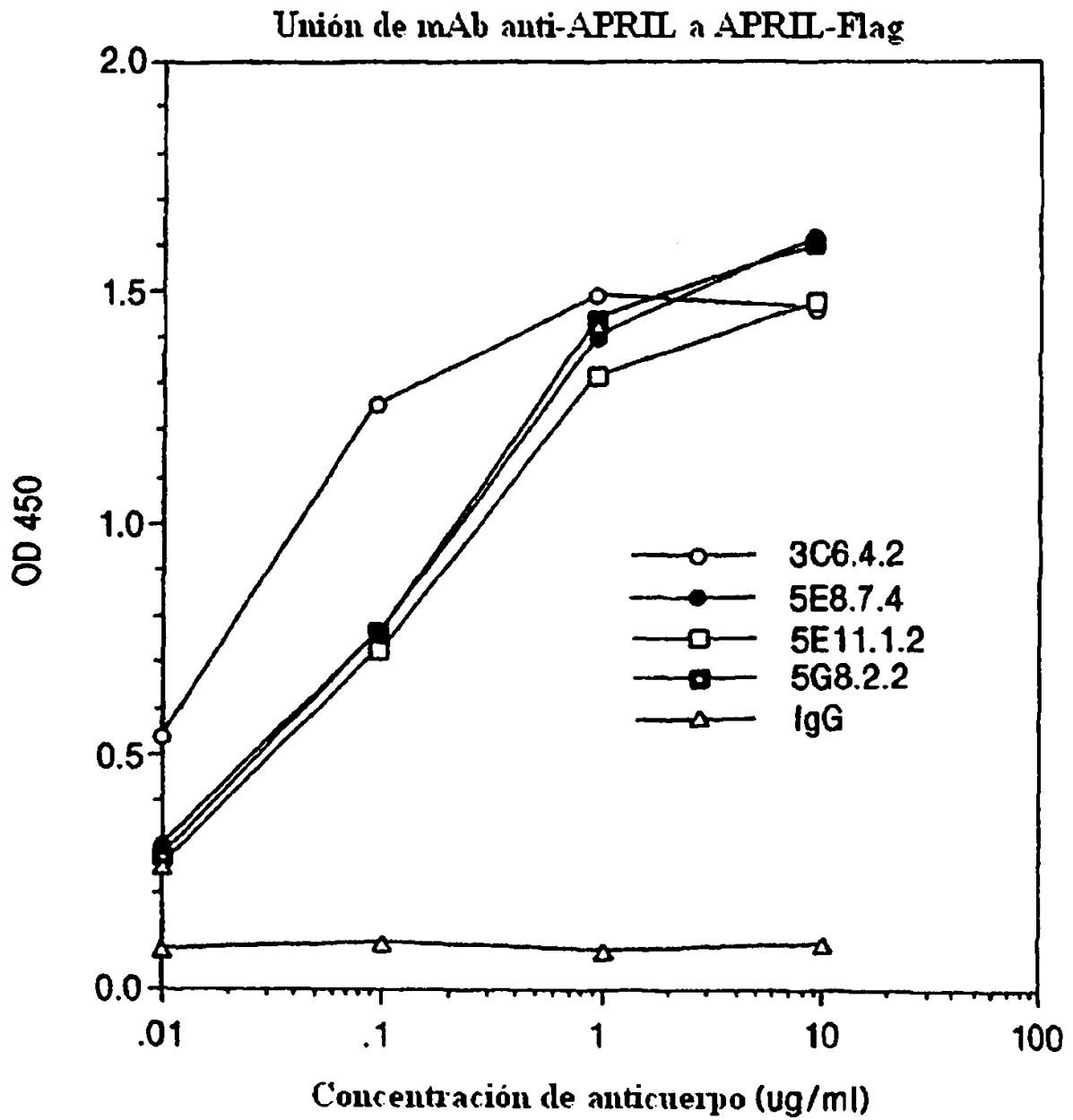


FIG. 14A

Resumen de los mAb anti-APRIL

mAb	Isotipo	Epitopo	Unión (ELISA)		Bloqueo de la unión de APRIL a	
			April	TALL	BCMA	TACI
3C6.4.2	IgG2a	C	++	-	+++	+
5E8.7.4	IgG2a	A	++	-	-	-
5E11.1.2	IgG1	C?	++	-	+	+
5G8.2.2	IgG2a	B	++	-	-	-

El mAb 5E11.1.2 podría unirse al mismo epítopo

FIG. 14B

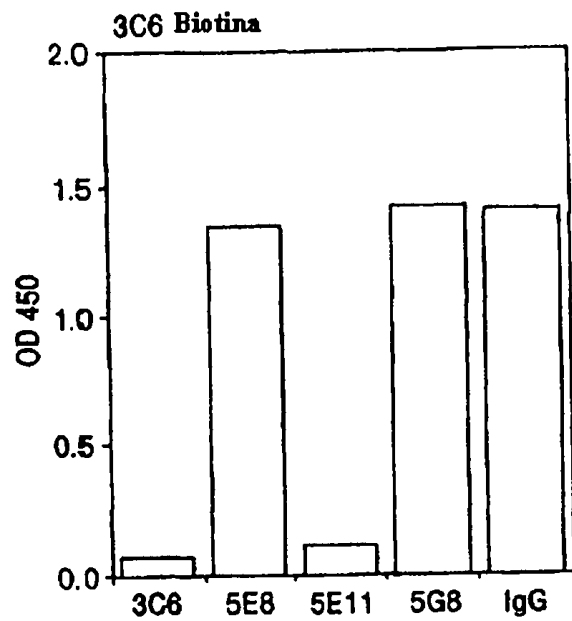


FIG. 15A

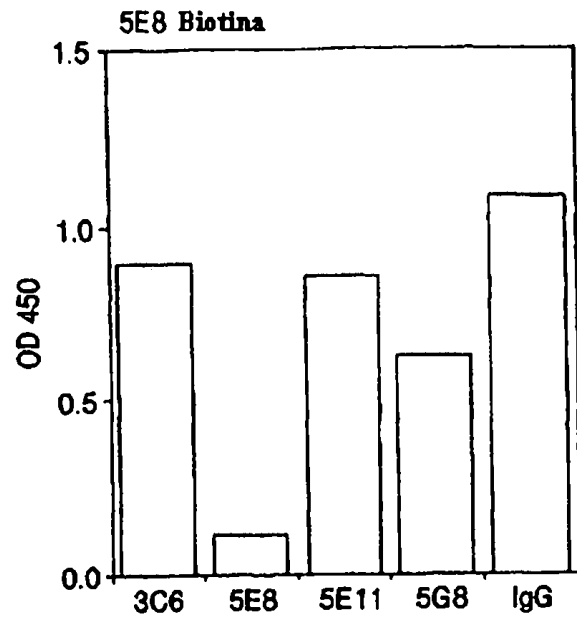


FIG. 15B

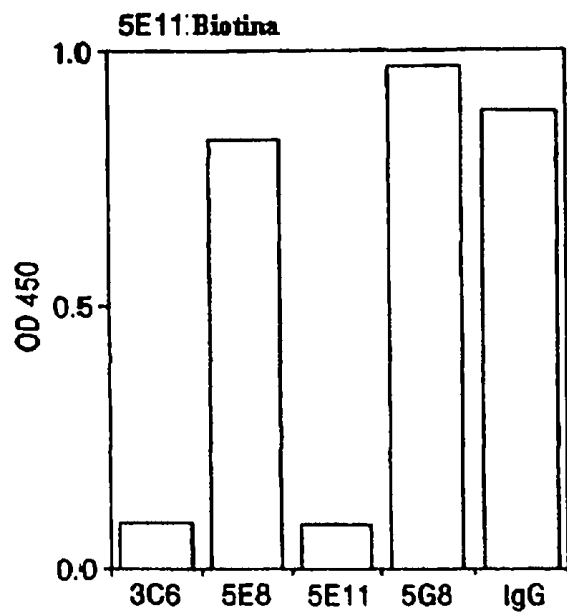


FIG. 15C

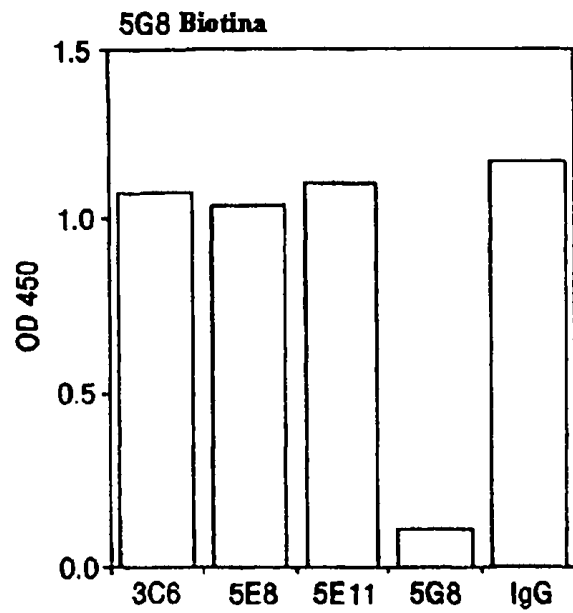


FIG. 15D

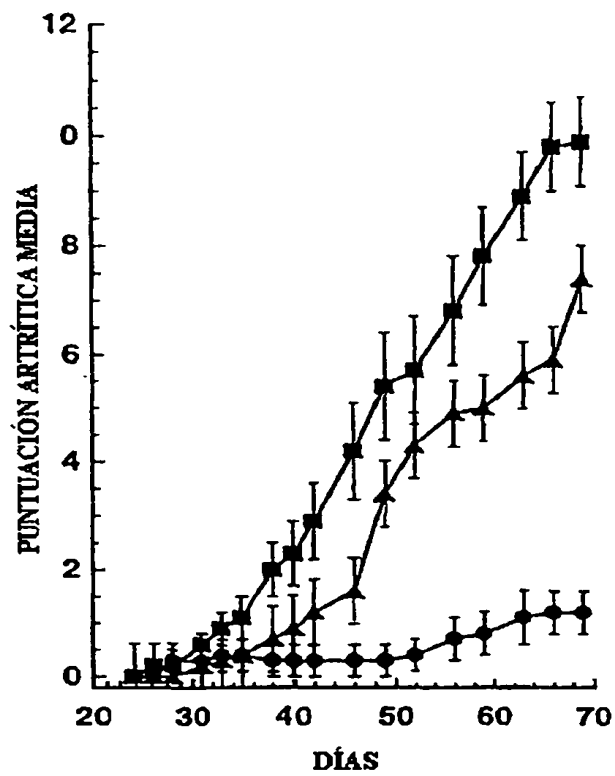


FIG. 16A

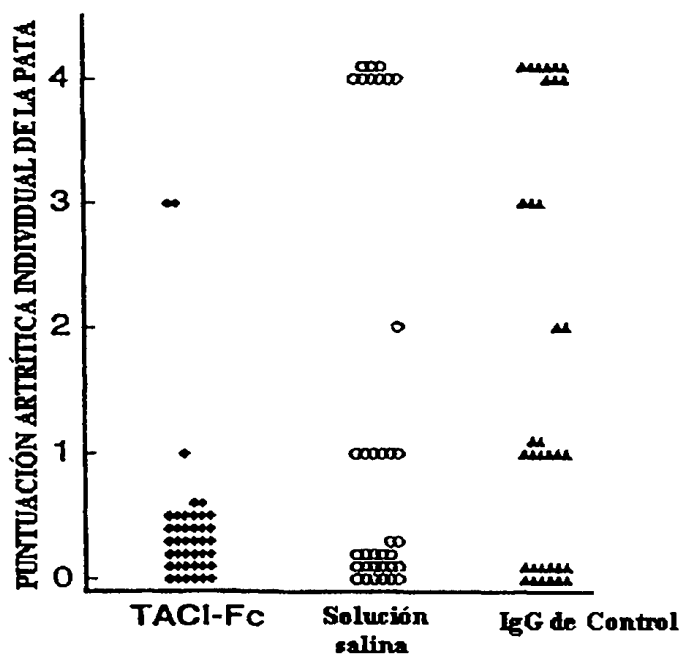


FIG. 16B



FIG. 17C

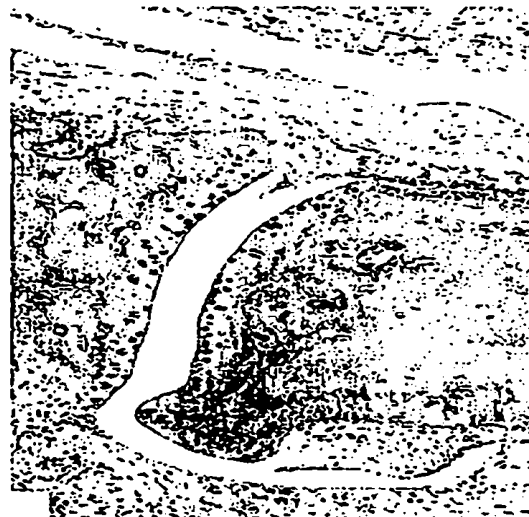


FIG. 17D



FIG. 17A



FIG. 17B

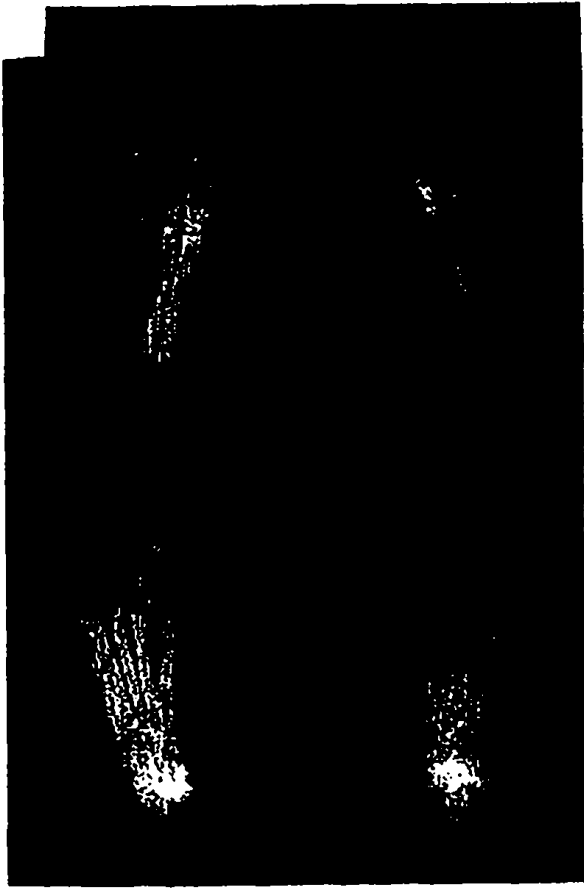


FIG. 17E



FIG. 17F

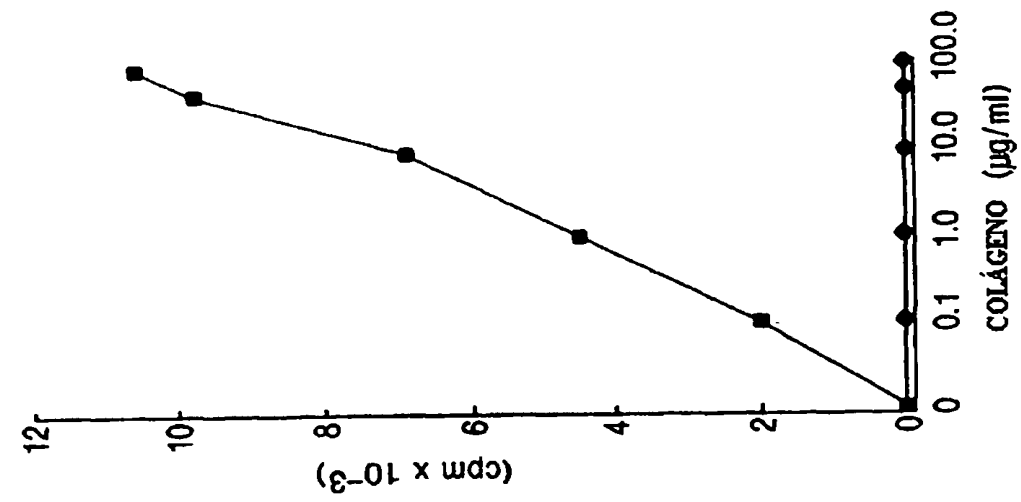


FIG. 18C

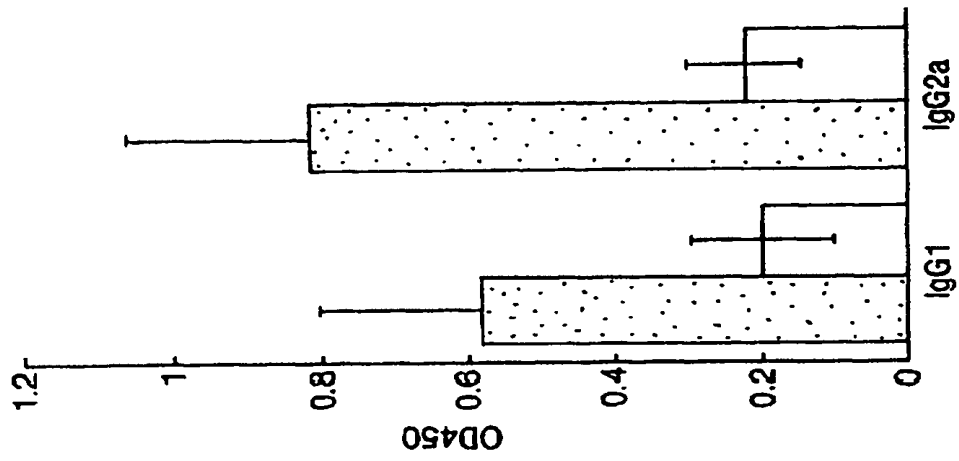


FIG. 18B

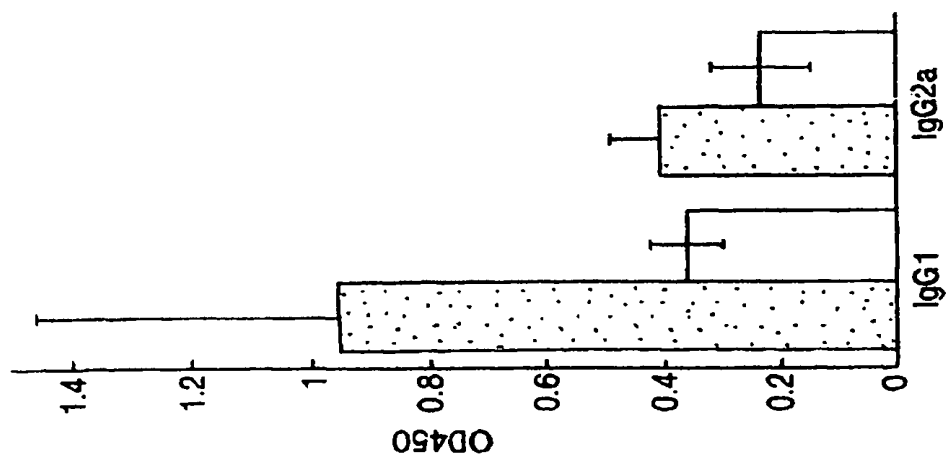


FIG. 18A

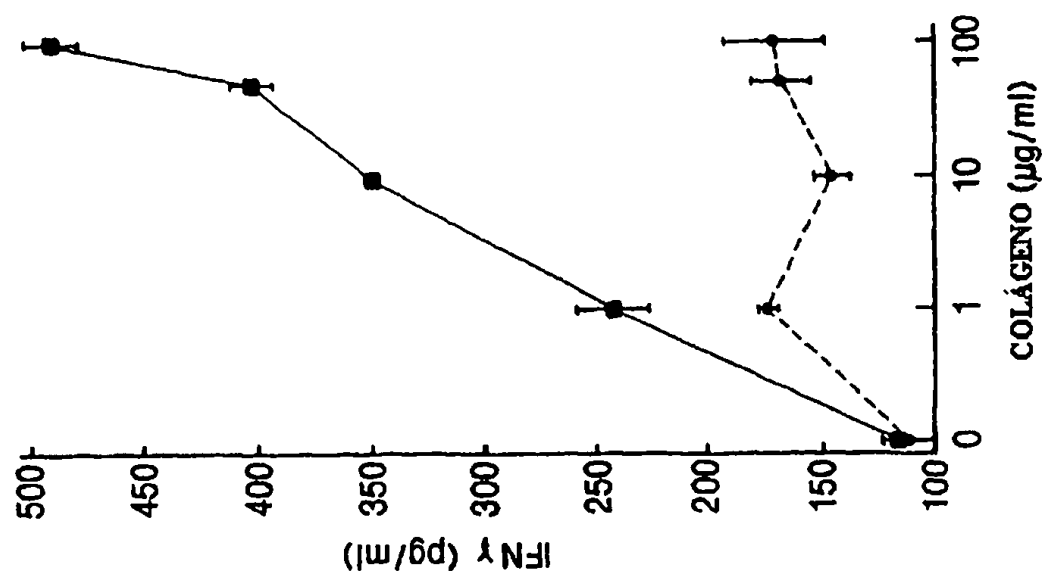


FIG. 18E

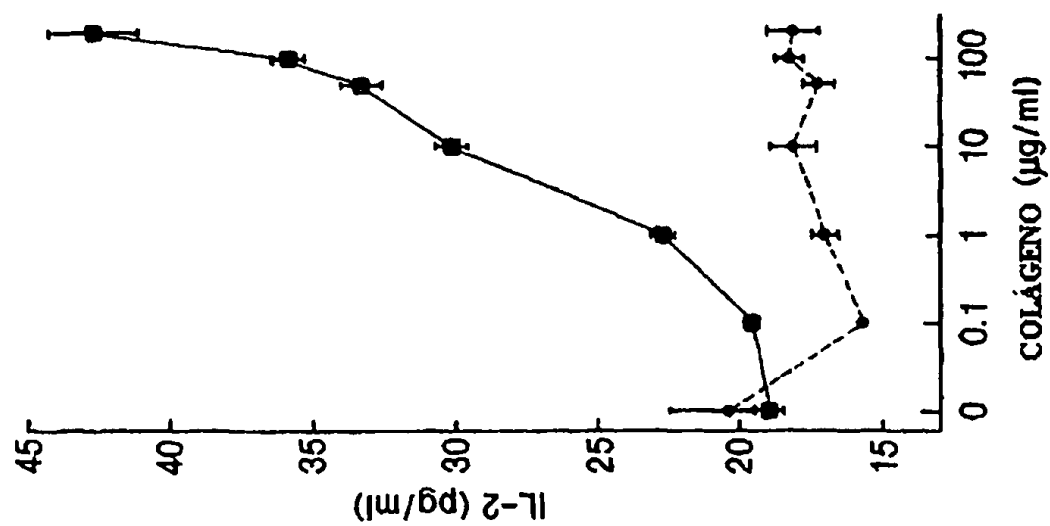


FIG. 18D

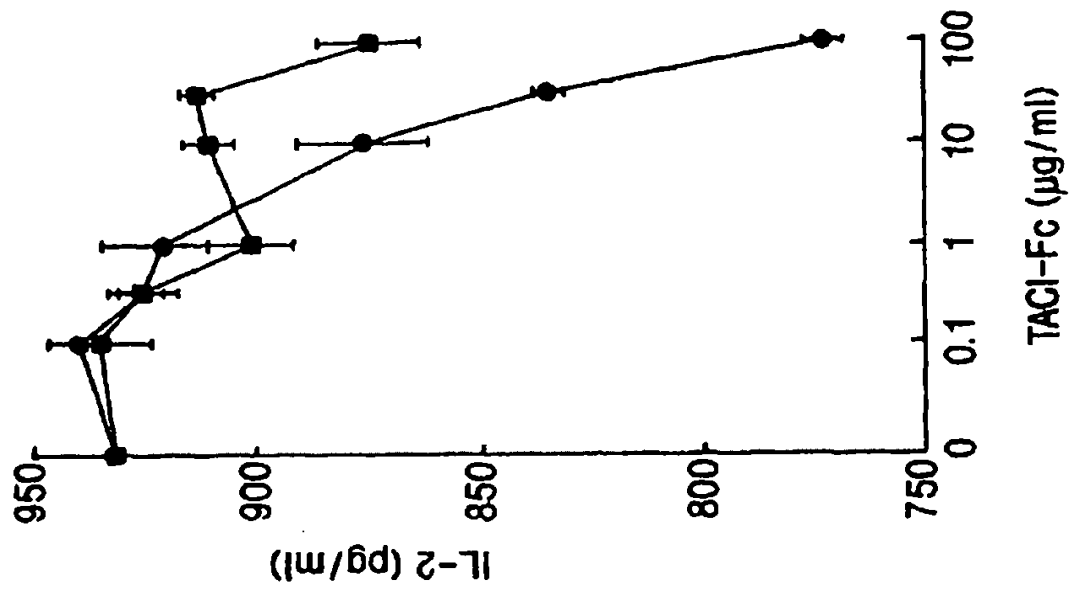


FIG. 19B

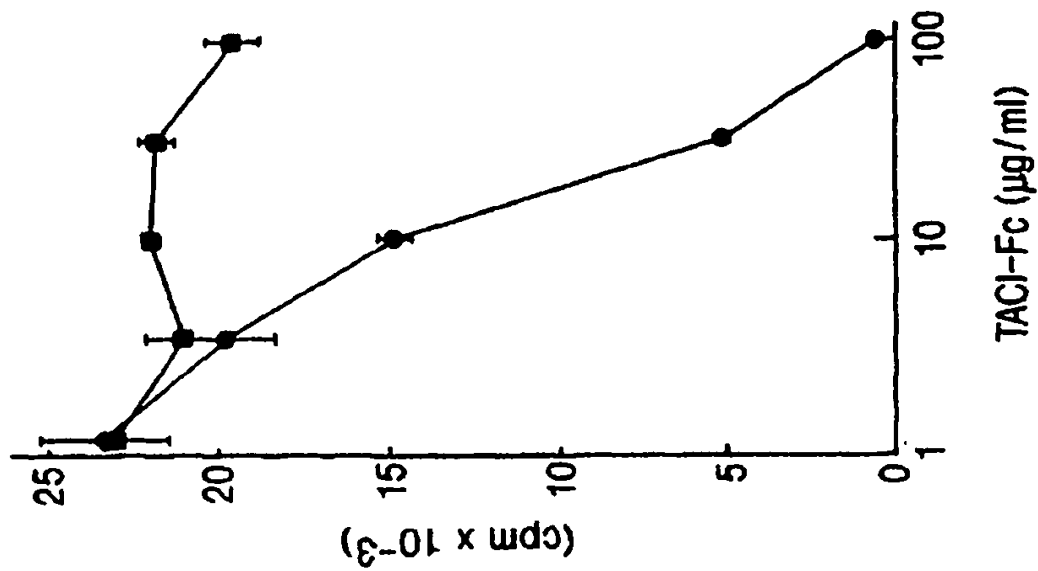


FIG. 19A

El tratamiento de ratones con TACI-Fc inhibe la EAE en ratones transgénicos MBP-TCR

