

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 153**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/12</b>	(2006.01)	<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/10</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)		
<b>C12P 21/02</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/715</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)		
<b>C07H 21/04</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07105107 .2**
- 96 Fecha de presentación: **06.09.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1842918**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **Polipéptidos y ácidos nucleicos receptores**

30 Prioridad:  
**18.09.2000 US 233152 P**  
**21.09.2000 US 234140 P**  
**13.02.2001 US 268499 P**  
**14.08.2001 US 312185 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.10.2012**

73 Titular/es:  
**BIAGEN IDEC MA INC.**  
**14 CAMBRIDGE CENTER**  
**CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US**

72 Inventor/es:  
**Ambrose, Christine M. y**  
**Thompson, Jeffrey S.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 388 153 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos y ácidos nucleicos receptores

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona una proteína receptora novedosa. La invención se refiere, en general, a ácidos nucleicos y polipéptidos. La invención se refiere, más particularmente, a ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos relacionados con un receptor para BAFF, un factor de activación de células B que pertenece a la familia de factor de necrosis tumoral ("TNF"), que está asociado con la expresión de células B e inmunoglobulinas. Este receptor puede emplearse en el tratamiento de cánceres, linfomas, enfermedades autoinmunitarias o trastornos genéticos heredados que implican células B.

**10 Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un receptor novedoso en la familia de TNF. Se ha identificado un receptor novedoso como el receptor de BAFF ("BAFF-R").

15 La familia de TNF consiste en pares de ligandos y sus receptores específicos denominados ligandos de la familia de TNF y receptores de la familia de TNF (Bazzoni y Beutler (1996) N. Engl. J. Med. 334(26): 1717-1725). La familia está implicada en la regulación del sistema inmunitario y posiblemente otros sistemas no inmunológicos. La regulación se realiza a menudo a nivel del "interruptor principal" ("master switch") de tal manera que la señalización de la familia de TNF puede dar como resultado un gran número de acontecimientos posteriores mejor tipificados mediante TNF. El TNF puede iniciar la respuesta inflamatoria protectora general de un organismo frente a una invasión extraña que implica la presentación alterada de moléculas de adhesión implicadas en el tráfico celular, producción de quimocina para transportar células específicas dentro de compartimientos específicos y el cebado de diversas células efectoras. Como tal, la regulación de estas rutas tiene un potencial clínico.

20 Se cree que la inducción de diversas respuestas celulares mediadas por tales citocinas de la familia de TNF está iniciada por su unión a receptores celulares específicos. Se han identificado al menos dos receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) y 75 kDa (TNF2) (Hohman *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264: 14927-14934; y Brockhaus *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3127-3131). Se han asociado muchos polimorfismos con ambos genes de receptor de TNF. Ambos TNF comparten la estructura típica de receptores de superficie celular incluyendo los dominios extracelular, transmembrana e intracelular. La parte extracelular de TNFR de tipo 1 y tipo 2 contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivo de cuatro dominios ricos en cisteína (CDR). Existe un patrón repetitivo similar de CDR en varias otras proteínas de superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento nervioso p75, el antígeno de células B CD40 entre otros.

25 Los receptores son potentes herramientas para esclarecer las rutas biológicas debido a su fácil conversión en proteínas de fusión con inmunoglobulina. Estas formas de receptor soluble dimérico son buenos inhibidores de acontecimientos mediados por o bien ligandos unidos a superficie o bien secretados. Mediante la unión a estos ligandos evitan que el ligando interaccione con receptores asociados a células que pueden señalizar. Estas proteínas de fusión receptor-Fc no sólo son útiles en el sentido experimental, sino que se han usado clínicamente de manera satisfactoria en el caso de TNF-R-Fc para tratar enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide y síndrome clínico agudo que acompaña a la administración de OKT3 (Eason *et al.* (1996) Transplantation 61(2): 224-228; Feldmann *et al.* (1996) Int. Arch. Allergy Immunol. 111(4): 362-365; y van Dullemen *et al.* (1995) Gastroenterol. 109(1):129-135). Puede considerarse que la manipulación de los muchos acontecimientos mediados por la señalización mediante la familia de TNF de receptores tendrá una amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades basadas en el sistema inmunitario y también un amplio intervalo de enfermedades humanas que tienen secuelas patológicas debido a la implicación del sistema inmunitario. Una forma soluble de un receptor recientemente descrito, osteoprotegerina, puede bloquear la pérdida de masa ósea y, por tanto, los acontecimientos controlados por la señalización de receptor de la familia de TNF no están necesariamente limitados a la regulación del sistema inmunitario (Simonet *et al.* (1997) Cell 89(2): 309-319). Los anticuerpos frente al receptor pueden bloquear la unión al ligando y por tanto también pueden tener una aplicación clínica. Tales anticuerpos tienen a menudo vidas muy duraderas y pueden tener ventajas sobre las proteínas de fusión receptor-Fc solubles que tienen semividas en sangre más cortas.

30 Aunque la inhibición de la ruta mediada por receptor representa la aplicación terapéutica más explotada de estos receptores, originariamente fue la activación de los receptores de TNF la que mostró promesa clínica (Aggarwal y Natarajan (1996) Eur Cytokine Netw. 7(2): 93-124). La activación de los receptores de TNF puede iniciar la muerte celular en la célula diana y por tanto la aplicación a tumores era y todavía es atractiva (Eggermont *et al.* (1996) Ann. Surg. 224(6): 756-765). El receptor puede activarse o bien mediante administración del ligando, es decir, la ruta natural, o bien algunos anticuerpos que pueden reticularse con el receptor también son potentes agonistas. Los anticuerpos tendrán una ventaja en la oncología ya que pueden permanecer en la sangre durante periodos mayores mientras que los ligandos tienen generalmente duraciones cortas en la sangre. Ya que muchos de estos receptores pueden expresarse más selectivamente en tumores o pueden sólo señalizar la diferenciación o muerte celular en tumores, los anticuerpos agonistas pueden ser buenas armas en el tratamiento del cáncer. Igualmente, muchos

acontecimientos inmunológicos positivos están mediados por receptores de la familia de TNF, por ejemplo las reacciones inflamatorias del huésped, producción de anticuerpos etc. y por tanto los anticuerpos agonistas podrán tener efectos beneficiosos sobre otras aplicaciones no oncológicas.

5 Paradójicamente, la inhibición de una ruta puede tener un beneficio clínico en el tratamiento de tumores. Por ejemplo, el ligando Fas se expresa por algunos tumores y esta expresión puede conducir a la muerte de linfocitos positivos para Fas facilitando así la capacidad del tumor para evadir al sistema inmunitario. En este caso, la inhibición del sistema Fas podría permitir al sistema inmunitario reaccionar frente al tumor de otras maneras ahora que el acceso es posible (Green y Ware (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(12): 5986-90).

10 El ligando de la familia de TNF BAFF, también conocido como TALL-1, THANK, BLyS y zTNF4 (Schneider *et al.* (1999) J. Exp. Med 189(11): 1747-1756; Shu *et al.* (1999) J. Leukoc. Biol. 65(5): 680-683; Mukhopadhyay *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274(23): 15978-15981; Moore *et al.* (1999) Science 285(5425): 260-263; Gross *et al.* (2000) Nature 404(6781): 995-999) potencia la supervivencia de las células B *in vitro* (Batten *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192(10): 1453-1466) y ha surgido como un regulador clave de las poblaciones de células B periféricas *in vivo*. Los ratones que sobreexpresan BAFF presentan hiperplasia de células B maduras y síntomas de lupus eritematoso sistémico (LES) (Mackay *et al.* (1999) J. Exp. Med. 190(11): 1697-1710; WO00/43032). Igualmente, algunos pacientes con LES tienen niveles significativamente aumentados de BAFF en su suero (Zhang *et al.* (2001) J. Immunol. 166(1): 6-10). Por tanto se ha propuesto que los niveles anómalamente elevados de este ligando pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias potenciando la supervivencia de células B autorreactivas (Batten *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192(10): 1453-1466).

20 El BAFF, una proteína de membrana de tipo II, se produce por células de origen mieloide (Schneider *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189(11): 1747-1756; Moore *et al.* (1999) Science 285(5425): 260-263) y se expresa o bien sobre la superficie celular o bien en una forma soluble (Schneider *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189(11): 1747-1756). Se ha mostrado previamente que dos miembros de la familia de receptores de TNF, BCMA y TACI, interaccionan con BAFF (Gross *et al.* (2000) Nature 404: 995-999; Thompson *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192(1): 129-135; Xia *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192: 137-143; Marsters *et al.* (2000) Curr. Biol. 10(13): 785-788; Shu *et al.* (2000) J. Leukoc. Biol. 65(5): 680-683; Wu *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275: 35478-35485; Yu *et al.* (2000) Nature 1mm. 1(3): 252-256).

### Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de "BAFF-R" una proteína receptora de BAFF, secuencias de polinucleótidos y los polipéptidos BAFF-R codificados por estas secuencias de ácido nucleico.

30 En el presente documento se ha descrito un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido BAFF-R, o un fragmento o derivado del mismo. El ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido idéntico en al menos un 50%, o idéntico en al menos un 90%, a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5).

35 En el presente documento se ha descrito una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que comprende una secuencia que se hibrida en condiciones de rigurosidad con una sonda de hibridación, consistiendo la secuencia de ácido nucleico de la sonda en la secuencia codificante de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) o el complemento de dicha secuencia codificante.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido que tiene la secuencia de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) con al menos una sustitución de aminoácido conservativa.

40 La secuencia de ácido nucleico puede codificar para un polipéptido que se une a BAFF.

El ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, un ácido nucleico que incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6).

45 El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un fragmento de ADN genómico, o puede ser una molécula de ADNc. También se ha descrito en el presente documento un vector que contiene uno o más de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento y una célula que contiene los vectores o ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

50 En el presente documento se ha descrito una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que codifica para una proteína de fusión que comprende al menos dos segmentos, en la que uno de los segmentos comprende un polipéptido o fragmento del mismo tal como se describe en las secuencias de aminoácidos expuestas en las realizaciones anteriores de la invención. La invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos dos o tres segmentos, en la que el primer segmento comprende un polipéptido señal heterólogo, el segundo comprende un polipéptido o fragmento del mismo tal como se describe en las secuencias de aminoácidos BAFF-R expuestas en las realizaciones anteriores de la invención y el tercer segmento comprende un polipéptido de inmunoglobulina. Alternativamente, el primer segmento comprende un fragmento de polipéptido de inmunoglobulina que contiene una secuencia señal y el segundo segmento comprende el fragmento de polipéptido BAFF-R.

En el presente documento se ha descrito un agente de unión sustancialmente puro que se une específicamente al polipéptido utilizado en las realizaciones de la invención.

En el presente documento se han descrito células huésped transformadas con un vector de expresión recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente.

- 5 En el presente documento se ha descrito una composición farmacéutica que incluye un ácido nucleico de BAFF-R y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención incluye un polipéptido BAFF-R sustancialmente purificado, por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos codificados por un ácido nucleico de BAFF-R para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R.

- 10 La invención también incluye una composición farmacéutica que incluye un polipéptido BAFF-R y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía en un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido BAFF-R, para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal. La invención también incluye una composición farmacéutica que incluye anticuerpo frente a BAFF-R y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también se refiere a anticuerpos aislados que se unen a un epítipo sobre un polipéptido codificado por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente.

- 15 También se han descrito en el presente documento kits que comprenden anticuerpos que se unen a un polipéptido codificado por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y un anticuerpo de control negativo.

Se ha descrito en el presente documento un procedimiento para producir un polipéptido BAFF-R. El procedimiento incluye proporcionar una célula que contiene un ácido nucleico de BAFF-R, por ejemplo, un vector que incluye un ácido nucleico de BAFF-R y cultivar la célula en condiciones suficientes para expresar el polipéptido BAFF-R codificado por el ácido nucleico. Entonces se recupera el polipéptido BAFF-R expresado de la célula. Preferiblemente, la célula produce poco o ningún polipéptido BAFF-R endógeno. La célula puede ser, por ejemplo, una célula procariota o una célula eucariota.

- 20 Se ha descrito en el presente documento un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a un polipéptido codificado por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente administrando al mamífero una cantidad del polipéptido suficiente para inducir la respuesta inmunitaria.

- 30 Se han descrito en el presente documento procedimientos para identificar un compuesto que se une a polipéptido BAFF-R poniendo en contacto el polipéptido BAFF-R con un compuesto y determinando si el compuesto se une al polipéptido BAFF-R.

Se han descrito en el presente documento procedimientos para identificar un compuesto que se une a una molécula de ácido nucleico que codifica para polipéptido BAFF-R poniendo en contacto ácido nucleico de BAFF-R con un compuesto y determinando si el compuesto se une a la molécula de ácido nucleico.

- 35 Se han descrito en el presente documento procedimientos para identificar un compuesto que modula la actividad de un polipéptido BAFF-R poniendo en contacto polipéptido BAFF-R con un compuesto y determinando si se modifica la actividad del polipéptido BAFF-R.

Se han descrito en el presente documento compuestos que modulan la actividad de polipéptido BAFF-R identificado poniendo en contacto un polipéptido BAFF-R con el compuesto y determinando si el compuesto modifica la actividad del polipéptido BAFF-R, se une al polipéptido BAFF-R, o se une a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido BAFF-R.

- 40 Se ha descrito en el presente documento un procedimiento para diagnosticar una afección mediada por células B, por ejemplo, un trastorno autoinmunitario o cáncer, en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de proteínas del sujeto y medir la cantidad de polipéptido BAFF-R en la muestra del sujeto. Entonces se compara la cantidad de BAFF-R en la muestra del sujeto con la cantidad de polipéptido BAFF-R en una muestra de proteínas control. Una alteración en la cantidad de polipéptido BAFF-R en la muestra de proteínas del sujeto con respecto a la cantidad de polipéptido BAFF-R en la muestra de proteínas control indica que el sujeto tiene una afección mediada por células B. Preferiblemente se toma una muestra control de un individuo compatible, es decir, un individuo de edad, sexo u otra afección general similar pero que no se sospecha que tenga la afección. Alternativamente, la muestra control puede tomarse del sujeto en un momento en el que no se sospecha que el sujeto tenga el trastorno. El polipéptido BAFF-R se detecta usando un anticuerpo frente a BAFF-R.

Se ha descrito en el presente documento un procedimiento para diagnosticar una afección mediada por células B, por ejemplo, trastorno autoinmunitario en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ácido

nucleico, por ejemplo, ARN o ADN, o ambos, del sujeto y medir la cantidad del ácido nucleico de BAFF-R en la muestra de ácido nucleico del sujeto. Entonces se compara la cantidad de muestra de ácido nucleico de BAFF-R en el ácido nucleico del sujeto con la cantidad de ácido nucleico de BAFF-R en una muestra control. Una alteración en la cantidad de ácido nucleico de BAFF-R en la muestra con respecto a la cantidad de BAFF-R en la muestra control indica que el sujeto tiene un estado autoinmunitario.

Se han descrito en el presente documento un procedimiento para diagnosticar un estado tumorigénico o autoinmunitario en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ácido nucleico del sujeto e identificar al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de BAFF-R en la muestra de ácido nucleico del sujeto. Entonces se compara la secuencia de nucleótidos de BAFF-R de la muestra del sujeto con una secuencia de nucleótidos de BAFF-R de una muestra control. Una alteración en la secuencia de nucleótidos de BAFF-R en la muestra con respecto a la secuencia de nucleótidos de BAFF-R en dicha muestra control indica que el sujeto tiene un estado de este tipo.

Todavía en un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido BAFF-R, o un anticuerpo anti-BAFF-R para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R.

Los estados que pueden ser diagnosticados, tratados, prevenidos o retrasados usando los anticuerpos frente a, las moléculas de ácido nucleico de, o polipéptidos BAFF-R, pueden ser un cáncer o un trastorno inmunoregulatorio. Las enfermedades incluyen aquellas que son de naturaleza autoinmunitaria tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y glomerulonefritis rápidamente progresiva. El agente terapéutico también tiene aplicación en trastornos de células plasmáticas tales como mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, amiloidosis asociada con inmunocitos o primaria y gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Las dianas oncológicas incluyen carcinomas de células B, leucemias y linfomas .

Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos descritos y/o reivindicados en el presente documento, pueden usarse con cualquier estado asociado con una proliferación celular no deseada. En una realización particular un polipéptido BAFF, o un anticuerpo anti BAFF pueden usarse para tratar células tumorales que expresan BAFF y/o BAFF-R.

Las composiciones que comprenden agonistas de BAFF-R (tales como anticuerpos que se unen a BAFF-R e imitan a BAFF) pueden usarse también para tratar inmunodeficiencias marcadas por bajas cantidades de células B, por ejemplo. Tales trastornos pueden estar provocados por radiación y/o quimioterapia, por ejemplo.

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para reducir la agregación de una proteína expresada de manera recombinante. El procedimiento comprende la comparación de homólogos de una proteína o proteína de fusión de la misma para determinar dominios conservados y aminoácidos no idénticos dentro de regiones conservadas. Generalmente, se cambia al menos un aminoácido no polar por un aminoácido polar no cargado o por prolina, alanina o serina.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos, y ejemplos son sólo ilustrativos, y no pretenden limitarse a ello.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

La **figura 1A** muestra la secuencia de ADN del ADNc de BJAB (SEQ ID N.º: 1) clonado en pJST576.

La **figura 1B** muestra la secuencia de ADN completa del ADNc del clon de IMAGE 2000271 (EST AI250289) (SEQ ID N.º: 2).

La **figura 2A** muestra la secuencia de nucleótidos de JST576 con un intrón eliminado tal como se prevé mediante el programa GENESCAN (SEQ ID N.º: 3).

La **figura 2B** muestra un gel de agarosa al 1% de productos de PCR obtenidos para BAFF-R usando o bien ADNc de primera cadena generado a partir de ARN de BJAB o IM-9 o bien ADNc de JST576. Carril 1. Digesto de HindIII de ADN de lambda. Carril 2. BAF-22SBAF-191 cebado con oligo dT de BJAB. Carril 3. BAF-226BAF-191 cebado con oligo dT de BJAB. Carril 4. BAF-22SBAF-191 cebado aleatoriamente con BJAB. Carril 5. BAF-226BAF-191 cebado aleatoriamente con BJAB. Carril 6. BAF-225/BAF-191 cebado con dT de IM-9. Carril 7. BAF-226/BAF-191 cebado con IM-9. Carril 8. BAF-225/BAF-191 cebado aleatoriamente con IM-9. Carril 9. BAF-226BAF-191 cebado

aleatoriamente con IM-9. Carril 10. BAF-22SBAF-191 de ADNc de JST576. Carril 11. BAF-226/BAF-191 de ADNc de JST576. Carril 12. BAF-225/BAF-191 sin plantilla. Carril 13. BAF-226/BAF-191 sin plantilla.

5 La **figura 2C** muestra la secuencia de JST576 (BAFF-R) madura (SEQ ID N.º: 4) (también número de registro de GenBank AF373846) determinada mediante secuenciación de un producto de PCR a granel que flanquea el intrón previsto a partir de ADNc de primera cadena de BJAB.

La **figura 2D** muestra la secuencia de aminoácidos de BAFF-R (JST576) (SEQ ID N.º: 5). El residuo A (Ala) en negrita indica la secuencia resultante del uso del sitio aceptor de corte y empalme alternativo. El dominio transmembrana previsto está encuadrado y la posible señal de detención de transferencia está subrayada.

10 La **figura 3** representa la versión de corte y empalme de JST576 (SEQ ID N.º: 6) que contiene la secuencia 5' UTR obtenida mediante RT-PCR a partir de ADNc de primera cadena de bazo humano y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID N.º: 7). Esta secuencia contiene un codón de detención en sentido 5' en marco con ATG.

La **figura 4A** muestra la secuencia del ADNc de BAFF-R murino (SEQ ID N.º: 8) (también número de registro de GenBank AF373847).

15 La **figura 4B** muestra la secuencia de aminoácidos de BAFF-R murino (SEQ ID N.º: 9). Los residuos de Cys están en negrita y subrayados y la región transmembrana prevista está encuadrada.

La **figura 4C** muestra la homología entre secuencias de proteínas BAFF-R humana (SEQ ID N.º: 10) y murina (SEQ ID N.º: 9).

20 La **figura 5** representa la unión de BAFF humano a células transfectadas con JST576. Se transfectaron conjuntamente células 293EBNA con pJST576 o CA336 (huTAC1) y un constructo indicador de GFP. Se sometieron a ensayo las células para determinar la unión de BAFF con myc-huBAFF biotinilado 1  $\mu\text{g/ml}$  seguido por SAV-PE.

25 La **figura 6** muestra la unión de BAFF humano y murino a células transfectadas con JST576. Se transfectaron conjuntamente células 293EBNA con pJST576 y un constructo indicador de GFP. Se sometieron a ensayo las células 24 h después para determinar la unión de BAFF con flag-huBAFF o flag-muBAFF 5  $\mu\text{g/ml}$  seguido por anticuerpo monoclonal M2 anti-flag e IgG-Pe de mono anti-ratón.

La **figura 7** muestra que APRIL no se une a células transfectadas con JST576. Se transfectaron conjuntamente células 293EBNA con pJST576 o CA336 (huTAC1) y un constructo indicador de GFP. Se sometieron a ensayo las células para determinar la unión de APRIL con myc-muAPRIL 1  $\mu\text{g/ml}$  seguido por IgG2b de rata anti-muAPRIL, FcG2b anti-rata biotinilado y SAV-PE.

30 La **figura 8** muestra que BAFF precipita una proteína a partir de células transfectadas con JST576. Se transfectaron células 293EBNA con o bien BAFF-R (pJST576), sólo vector (CH269) o bien huTAC1 (CA336) y se sometieron a pulsos con  $^{35}\text{S}$  cisteína y metionina. Se inmunoprecipitaron extractos con flag-huBAFF y se hicieron pasar sobre un gel de SDS-PAGE reductor. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

35 La **figura 9** representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N.º: 11) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID N.º: 12) de un gen que codifica para un BAFF-R humano: Fc: los residuos de ácido nucleico 1-63 codifican para la secuencia señal IgG-kappa murina; los residuos de ácido nucleico 64-66 se usan para introducir un sitio de enzima de restricción, los residuos de ácido nucleico 67-276 codifican para parte del dominio extracelular de BAFF-R, los residuos de ácido nucleico 277-279 se usaron para introducir un sitio de enzima de restricción y los residuos de ácido nucleico 280-960 codifican para la región Fc de IgG1 humana.

40 La **figura 10** representa los resultados del análisis de transferencia de tipo Northern usando el fragmento EcoNI de JST56 como sonda. Todas las exposiciones se realizan a los 4 días. 10A: inmunotransferencia de tipo II humana de Clontech; 10B: transferencia de múltiples tejidos de 12 carriles humana de Clontech; 10C: transferencia de múltiples tejidos de tipo II humana de Clontech.

45 La **figura 11** muestra el resultado del análisis de transferencia de tipo Northern de 20  $\mu\text{g}$  de ARN total aislado a partir de diversas líneas celulares. La transferencia se analizó con sondas con un fragmento de restricción EcoNI de JST576 y se expuso durante 4 días. La capacidad de las líneas celulares para unirse a BAFF, según se determina mediante análisis de FACS, se indica bajo el carril.

La **figura 12** muestra los resultados de inmunoprecipitación usando BAFF-R: Fc. Se inmunoprecipita BAFF humano con BAFF-R: Fc o BCMA: Fc, pero no Fn14-Fc. La proteína BAFF control se muestra en el carril 1.

50 La **figura 13** muestra que BAFF-R: Fc humano bloquea la unión de BAFF humano a células BJAB. Se muestran los resultados de los análisis de FACS en la figura 13A. La curva E representa la unión de BAFF biotinilado a células BJAB en ausencia de BAFF-R: Fc. Las curvas B-D representan la capacidad de BAFF para unirse a células BJAB en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  o 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. La curva A es sólo la curva de segunda

etapa. La figura 13B ilustra la capacidad de diversas concentraciones de BAFF-R: Fc (cuadrados) comparado con TACI: Fc (triángulos) o una proteína de fusión no específica, LT\_R: Fc (círculos), para bloquear la unión de BAFF a las células BJAB que expresan receptor.

5 La **figura 14** muestra la capacidad de BAFF-R: Fc para bloquear la estimulación conjunta inducida por BAFF de células B esplénicas. Se muestra un gráfico de la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina (cpm) frente a cantidades crecientes de hBAFF (ng/ml).

La **figura 15** muestra que el tratamiento con BAFF-R: Fc1 da como resultado una pérdida de células B periféricas en ratones normales.

10 La **figura 16** muestra que el tratamiento de ratones con BAFF-R: Fc humano y de ratón reduce el número de células B B220+ esplénicas.

La **figura 17** muestra que la administración de BAFF-R: Fc a ratones reduce el porcentaje de células B B220+ de ganglios linfáticos.

La **figura 18** muestra que la administración de BAFF-R: Fc a ratones reduce las células B B220+ en la sangre periférica.

15 La **figura 19A** muestra datos de FACS a partir de sobrenadantes de cuatro clones que producen anticuerpos que se unen a BAFF-R. También se muestra un sobrenadante control que no contiene anticuerpos que se unen a BAFF-R.

20 La **figura 19B** muestra un histograma que muestra que dos clones que bloquean la unión de BAFF a BAFF-R (a) muestra el control sin BAFF; (b) muestra la capacidad de bloqueo del anticuerpo del clon 2; (c) muestra la capacidad de bloqueo del anticuerpo del clon 9; y (d) muestra la curva a partir de un anticuerpo control que no se une a BAFF-R.

25 La **figura 20** muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares BAFF-R: Fc humano (hBAFF-R) y BAFF-R: Fc de ratón (mBAFF-R) y el porcentaje de agregación observado con la expresión de las proteínas de fusión de Fc que contienen las secuencias indicadas. Los clones de JST numerados representan las secuencias de aminoácidos que muestran mutaciones (mostradas subrayadas) en las secuencias originales y la agregación resultante de la proteína expresada. Se muestran las secuencias parciales para BAFF-R humano (aminoácidos 2-71 de SEQ ID N.º: 10; SEQ ID N.º: 13) y de ratón (aminoácidos 2-66 de SEQ ID N.º: 9; SEQ ID N.º: 14); y las porciones correspondientes para los siguientes clones: JST659 (SEQ ID N.º: 15), JST660 (SEQ ID N.º: 16), JST661 (SEQ ID N.º: 17), JST662 (SEQ ID N.º: 18), JST663 (SEQ ID N.º: 19), JST673 (SEQ ID N.º: 20), JST 674 (SEQ ID N.º: 21), JST675 (SEQ ID N.º: 22), JST672 (SEQ ID N.º: 23), JST676 (SEQ ID N.º: 24), JST671 (SEQ ID N.º: 25), JST677 (SEQ ID N.º: 26), JST678 (SEQ ID N.º: 27), JST664 (SEQ ID N.º: 28), JST668 (SEQ ID N.º: 29), JST665 (SEQ ID N.º: 30), JST666 (SEQ ID N.º: 31) y JST667 (SEQ ID N.º: 32).

30 La **figura 21** muestra una autorradiografía de proteínas inmunoprecipitadas usando lisados preparados a partir de BAFF-R-i.c.d. (dominio intracelular de BAFF-R) (carril 1), o células transfectadas con vector control (carril 2). Se transfectaron aproximadamente  $6 \times 10^6$  células 293E con un constructo que codificaba para BAFF-R-i.c.d. o plásmido simulado. Tras 48 horas, se marcaron metabólicamente las células con <sup>35</sup>S durante 24 horas, se lisaron con tampón de lisis, se aclararon previamente y se inmunoprecipitaron con un AcM anti-myc, 9E10. Se separaron los inmunoprecipitados mediante SDS-PAGE al 10-20% en condiciones de reducción.

### Descripción detallada de la invención

40 Los trabajos de referencia, patentes, solicitudes de patente y bibliografía científica, incluyendo números de acceso en secuencias de base de datos de GenBank, a las que se hace referencia en el presente documento establecen el conocimiento de los expertos en la técnica.

45 Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la técnica incluyen Ausubel *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York (1989); Kaufman *et al.*, Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991).

50 Se han descrito en el presente documento ácidos nucleicos de BAFF-R, ácidos nucleicos aislados que codifican para polipéptido BAFF-R una parte del mismo, polipéptidos BAFF-R, vectores que contienen estos ácidos nucleicos, células huésped transformadas con los ácidos nucleicos de BAFF-R, anticuerpos anti-BAFF-R y composiciones farmacéuticas. También se describen procedimientos para preparar polipéptidos BAFF-R, así como procedimientos de detección, diagnóstico, tratamiento de estados usando estos compuestos y procedimientos de selección de compuestos que modulan la actividad de polipéptido BAFF-R.

Los ácidos nucleicos de y polipéptidos BAFF-R, así como anticuerpos frente a BAFF-R, así como composiciones farmacéuticas tratadas en el presente documento, son útiles, entre otros, para tratar el cáncer y/o estados inmunorreguladores. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedades mediadas por células B que son de naturaleza autoinmunitaria tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Este agente terapéutico también tiene aplicación en trastornos de células plasmáticas tales como mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, amiloidosis asociada con inmunocitos o primaria y gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Las dianas oncológicas incluyen linfomas, leucemias y carcinomas de células B.

### Ácidos nucleicos de BAFF-R

Un aspecto descrito en el presente documento se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para proteínas BAFF-R o partes biológicamente activas de las mismas. También se describen fragmentos de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican para BAFF-R (por ejemplo, ARNm de BAFF-R) y fragmentos para su uso como cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico de BAFF-R. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "molécula de ácido nucleico" incluya moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de las mismas. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

Las "sondas" se refieren a secuencias de ácido nucleico de longitud variable, preferiblemente entre al menos aproximadamente 10 nucleótidos (nt) o hasta aproximadamente, por ejemplo, 6.000 nt, dependiendo del uso. Se usan las sondas en la detección de secuencias de ácido nucleico idénticas, similares, o complementarias. Habitualmente se obtienen sondas de mayor longitud a partir de una fuente natural o recombinante, son sumamente específicas e hibridan mucho más lentamente que los oligómeros. Las sondas pueden ser de cadena sencilla o doble y diseñarse para tener especificidad en la PCR, tecnologías de hibridación basadas en membranas, o tecnologías de tipo ELISA. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector, moléculas de ADN recombinante mantenidas en una célula huésped heteróloga, moléculas de ácido nucleico parcial o sustancialmente purificadas y moléculas de ADN o ARN sintéticas. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean de manera natural al ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de BAFF-R aislada puede contener menos de aproximadamente 50 kb, 25 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de manera natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico se ha descrito en el presente documento, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), o un complemento de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos, puede aislarse usando técnicas de biología molecular habituales y la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Usando todo o una parte de las secuencias de ácido nucleico de las figuras 1A, B, 2A, C y 3 como sonda de hibridación, pueden aislarse secuencias de ácido nucleico de BAFF-R usando técnicas de clonación e hibridación habituales (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Ausubel, *et al.*, Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1993).

Un ácido nucleico puede amplificarse usando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas de amplificación por PCR habituales. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de la secuencia de ADN. Además, pueden prepararse los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de nucleótidos de BAFF-R mediante técnicas de síntesis habituales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático.

Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una serie de residuos de nucleótidos unidos, oligonucleótido que tiene un número suficiente de bases de nucleótidos para usarse en una reacción de PCR. Una secuencia de oligonucleótidos corta puede basarse en, o diseñarse a partir de, una secuencia de ADN genómico o ADNc y usarse para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ARN o ADN idéntico, similar o complementario en un tejido o célula particular. Los oligonucleótidos comprenden partes de una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 10 nt y hasta 50 nt, de manera preferible aproximadamente de 15 nt a 30 nt. Pueden sintetizarse químicamente y usarse como sondas.

Una molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6). Una molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), o una parte de esta secuencia de nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) es una que es lo suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) como para que pueda unirse mediante enlaces de hidrógeno con pocos o ningún apareamiento erróneo a la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) formando así un dúplex estable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “complementario” se refiere a un apareamiento de bases de Watson-Crick o Hoogsteen entre unidades de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico y el término “unión” se refiere a la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos o polipéptidos o compuestos asociados o combinaciones de los mismos. La unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, de Van der Waals, hidrófobas, etc. Una interacción física puede ser o bien directa o bien indirecta. Las interacciones indirectas pueden realizarse mediante, o debido a, los efectos de otro polipéptido o compuesto. La unión directa se refiere a interacciones que no tienen lugar mediante el, o debido al, efecto de otro polipéptido o compuesto, sino que en vez de eso se realizan sin otros productos intermedios químicos sustanciales.

Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender sólo una parte de la secuencia de ácido nucleico de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), por ejemplo, un fragmento que puede usarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica para una parte biológicamente activa de BAFF-R. Los fragmentos proporcionados en el presente documento se definen como secuencias de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos) o al menos 4 aminoácidos (contiguos), una longitud suficiente para permitir la hibridación específica en el caso de ácidos nucleicos o para un reconocimiento específico de un epítipo en el caso de aminoácidos, respectivamente, y son como mucho alguna parte menor de la secuencia de longitud completa. Los fragmentos pueden derivarse de cualquier parte contigua de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de elección. Los derivados son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos formados a partir de compuestos nativos o bien directamente o bien mediante modificación o sustitución parcial. Los análogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, al compuesto nativo pero se diferencian del mismo con respecto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o de un origen evolucionario diferente y pueden tener una actividad metabólica similar u opuesta comparado con el tipo natural.

Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o distintos de la longitud completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificados, tal como se describe a continuación. Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o proteínas de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas de la invención, en diversas realizaciones, con una identidad de al menos aproximadamente el 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, o incluso el 99% (con una identidad preferida del 80-99%) con respecto a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza mediante un programa de homología informático conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico codificante puede hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica para las proteínas anteriormente mencionadas en condiciones de rigurosidad, de rigurosidad moderada o de baja rigurosidad. Véase por ejemplo Ausubel, *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1993 y a continuación. Un programa a modo de ejemplo es el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) usando los parámetros por defecto, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489).

Una “secuencia de ácido nucleico homóloga” o “secuencia de aminoácidos homóloga”, o variaciones de las mismas, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de nucleótidos o nivel de aminoácidos tal como se trató anteriormente. Las secuencias de nucleótidos homólogas codifican para aquellas secuencias que codifican para isoformas de polipéptido BAFF-R. Las isoformas pueden expresarse en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado de, por ejemplo, un corte y empalme alternativo del ARN. Alternativamente, las isoformas pueden codificarse por diferentes genes. Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido BAFF-R de especies distintas a seres humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos y por tanto pueden incluir, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo y otros organismos. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a, mutaciones y variaciones alélicas que se producen de manera natural de las secuencias de nucleótidos expuestas en el presente documento. Sin embargo, una secuencia de nucleótidos homóloga no incluye la secuencia de nucleótidos que codifica para proteína BAFF-R humana. Las secuencias de ácido nucleico homólogas incluyen aquellas secuencias de ácido nucleico que

codifican para sustituciones de aminoácidos conservativas (véase a continuación) en la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) así como un polipéptido que tiene actividad de BAFF-R. Una secuencia de aminoácidos homóloga no codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido BAFF-R humano.

5 La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación del gen de BAFF-R humano permite la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la identificación y/o clonación de homólogos de BAFF-R en otros tipos de células, por ejemplo, a partir de otros tejidos, así como homólogos de BAFF-R a partir de otros mamíferos. La/El sonda/cebador comprende normalmente un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido comprende normalmente una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de rigurosidad con al menos aproximadamente 12, 25, 50, 100,150, 200, 250, 300, 350 o 400 nucleótidos consecutivos de una  
10 secuencia de nucleótidos de cadena sentido de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o una secuencia de nucleótidos de cadena antisentido de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o de un mutante que se produce de manera natural de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6).

Las sondas basadas en la secuencia de nucleótidos de BAFF-R humana pueden usarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican para las mismas proteínas o proteínas homólogas. En diversas realizaciones, la sonda comprende además un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Tales sondas pueden usarse como  
20 parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejido que expresa erróneamente una proteína BAFF-R, tal como midiendo el nivel de un ácido nucleico que codifica para BAFF-R en una muestra de células de un sujeto por ejemplo, detectando niveles de ARNm de BAFF-R o determinando si se ha mutado o deletado un gen de BAFF-R genómico.

“Un polipéptido que tiene una parte biológicamente activa de BAFF-R” se refiere a polipéptidos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido de la presente invención, incluyendo formas maduras, según se mide en un ensayo biológico particular con o sin dependencia de la dosis. Un fragmento de ácido nucleico que codifica para una “parte biológicamente activa de BAFF-R” puede prepararse aislando una parte de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) que codifica para un polipéptido que tiene una actividad biológica de BAFF-R (las actividades biológicas de las proteínas BAFF-R se describen a continuación), expresando la parte codificada de la proteína BAFF-R (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la parte codificada de BAFF-R. Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico que codifica para una parte biológicamente activa de BAFF-R puede incluir opcionalmente un dominio de unión a BAFF. En otra realización, un fragmento de ácido nucleico que codifica para una parte biológicamente activa de BAFF-R incluye una o más regiones.  
35

#### **Variantes de BAFF-R**

Se han descrito en el presente documento moléculas de ácido nucleico que se diferencian de las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) debido a la degeneración del código genético. Estos ácidos nucleicos codifican por tanto para la misma proteína BAFF-R que la codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6). Una molécula de ácido nucleico aislada puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2D (SEQ ID N.º: 5).  
40

Además de la secuencia de nucleótidos de BAFF-R humana mostrada en cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de BAFF-R dentro de una población (por ejemplo, la población de seres humanos). Tales polimorfismos genéticos en el gen de BAFF-R pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Tal como se usa en el presente documento, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica para una proteína BAFF-R, preferiblemente una proteína BAFF-R de mamífero. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado normalmente una variación del 1-5% en la secuencia de nucleótidos del gen de BAFF-R. Las variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en BAFF-R pueden ser resultado de la variación alélica natural y no alteran la actividad funcional de BAFF-R.  
55

Además, se pretende que las moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas BAFF-R de otras especies, y por tanto tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias humanas de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) estén dentro del alcance de la invención. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogos de los ADNs de BAFF-R descritas en el presente documento pueden aislarse basándose en  
60

su homología con los ácidos nucleicos de BAFF-R humanos descritos en el presente documento usando los ADNc humanos, o una parte de los mismos, tales como una sonda de hibridación según técnicas de hibridación habituales en condiciones de rigurosidad de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse ADNc de BAFF-R humano soluble basándose en su homología con BAFF-R unido a membrana humano. Igualmente, puede aislarse ADNc de BAFF-R humano unido a membrana basándose en su homología con BAFF-R humano soluble.

En consecuencia, una molécula de ácido nucleico aislada puede tener al menos 6 nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones de rigurosidad con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6). El ácido nucleico puede tener al menos 10, 25, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud. Una molécula de ácido nucleico aislada se puede hibridar con la región codificante. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "se hibrida en condiciones de rigurosidad" describa condiciones para la hibridación y lavado en las que las secuencias de nucleótidos homólogas en al menos un 60% entre sí permanecen normalmente hibridadas entre sí.

Pueden obtenerse secuencias homólogas (es decir, ácidos nucleicos que codifican para proteínas BAFF-R derivadas de especies distintas al ser humano) o relacionadas de otro modo (por ejemplo, parálogas) mediante hibridación con rigurosidad baja, moderada o alta con toda o una parte de la secuencia humana particular como sonda usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la hibridación y clonación de ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación de rigurosidad" se refiere a condiciones en las que una sonda, cebador u oligonucleótido se hibridará con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones de rigurosidad dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas superiores que las secuencias más cortas. Generalmente, las condiciones de rigurosidad se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores a la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>f</sub> es la temperatura (en concentración de ácido nucleico, pH y fuerza iónica definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. Ya que las secuencias dianas están presentes generalmente en exceso, a la T<sub>f</sub>, el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. Normalmente, las condiciones de rigurosidad serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente ión de sodio 1,0 M, normalmente ión de sodio a aproximadamente de 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas, cebadores u oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 nt a 50 nt) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas, cebadores y oligonucleótidos más largos. Las condiciones de rigurosidad también pueden lograrse con la adición de agentes de desestabilización, tales como formamida.

Las condiciones de rigurosidad las conocen los expertos en la técnica y pueden encontrarse en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias homólogas en al menos aproximadamente un 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% entre sí permanecen normalmente hibridadas entre sí.

Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de rigurosidad es la hibridación en un tampón con alto contenido en sales que comprende 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 mg/ml a 65°C. Esta hibridación se sigue por uno o más lavados en 0,2X SSC, BSA al 0,01% a 50°C. Una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que se hibrida en condiciones de rigurosidad con la secuencia de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 6 corresponde a una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "que se produce de manera natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica para una proteína natural).

Una secuencia de ácido nucleico puede hibridarse con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o fragmentos, análogos o derivados de las mismas, en condiciones de rigurosidad moderada. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de rigurosidad moderada es la hibridación en 6X SSC, 5X solución de Denhardt, SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 mg/ml a 55°C, seguido por uno o más lavados en 1X SSC, SDS al 0,1 % a 37°C. En la técnica se conocen bien otras condiciones de rigurosidad moderada que pueden usarse. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990.

Un ácido nucleico puede hibridarse con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 2B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o fragmentos, análogos o derivados de las mismas, en condiciones de rigurosidad baja. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de rigurosidad baja es la hibridación en formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 mg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/v) a 40°C, seguido por uno o

más lavados en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1% a 50°C. En la técnica se conocen bien otras condiciones de rigurosidad baja que pueden usarse (por ejemplo, según se emplean para hibridaciones de especies cruzadas). Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Kriegler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990; Shilo y Weinberg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789-6792.

### Mutaciones conservativas

Además de las variantes alélicas que se producen de manera natural de la secuencia de BAFF-R que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará además que pueden introducirse cambios mediante mutación en la secuencia de nucleótidos de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) conduciendo así a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína BAFF-R codificada, sin alterar la capacidad funcional de la proteína BAFF-R. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" en la secuencia de cualquiera de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6). Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de la secuencia de tipo natural de BAFF-R sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Por ejemplo, particularmente se prevé que los residuos de aminoácidos que se conservan entre las proteínas BAFF-R de la presente invención, no son susceptibles a la alteración.

Además, particularmente también se prevé que los residuos de aminoácidos que se conservan entre miembros de la familia de las proteínas BAFF-R de la presente invención, no son susceptibles a la alteración. Por ejemplo, las proteínas BAFF-R de la presente invención pueden contener al menos un dominio que es una región normalmente conservada en miembros de la familia de TNF. Como tales, no es probable que estos dominios conservados sean susceptibles a la mutación. Sin embargo, otros residuos de aminoácidos (por ejemplo, aquellos que no se conservan o sólo se conservan parcialmente entre miembros de las proteínas BAFF-R) pueden no ser esenciales para la actividad y por tanto es probable que sean susceptibles a la alteración.

Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas BAFF-R que contienen cambios en los residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad. Tales proteínas BAFF-R se diferencian en la secuencia de aminoácidos de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5), aunque conservan la actividad biológica. En una realización, la proteína comprende una secuencia de aminoácidos homóloga en al menos aproximadamente un 45% a la secuencia de aminoácidos de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5). Preferiblemente, la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico es homóloga en al menos aproximadamente un 60% a la figura 2D (SEQ ID N.º: 5), más preferiblemente en al menos aproximadamente un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% y lo preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente un 99% a la figura 2D (SEQ ID N.º: 5).

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una proteína BAFF-R homóloga a la proteína de la figura 2D puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada.

Pueden introducirse las mutaciones en la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), o la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), por ejemplo, mediante técnicas habituales tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. Una "sustitución de aminoácidos no conservativa" es una en la que el residuo de aminoácidos se sustituye con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han identificado familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales con ramificaciones en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácidos no esenciales previsto en BAFF-R se sustituye por otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia que codifica para BAFF-R, tal como mediante mutagénesis por saturación, y pueden examinarse los mutantes resultantes para detectar actividad biológica de BAFF-R para identificar mutantes que conservan actividad. Tras la mutagénesis de cualquiera de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) y la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), puede expresarse la proteína codificada mediante cualquier tecnología recombinante conocida en la técnica y puede determinarse la actividad de la proteína.

En una realización, puede someterse a ensayo una proteína BAFF-R mutante para determinar (1) la capacidad para formar interacciones proteína: proteína con otras proteínas BAFF-R, otras proteínas de superficie celular, o partes biológicamente activas de las mismas, (2) la formación de complejos entre una proteína BAFF-R mutante y un ligando de BAFF-R; (3) la capacidad de una proteína BAFF-R mutante para unirse a una proteína diana intracelular o parte biológicamente activa de la misma; (por ejemplo, proteínas de avidina); (4) la capacidad para unirse a BAFF; o (5) la capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo frente a proteína BAFF-R.

La invención proporciona mutantes específicos que codifican para un polipéptido BAFF-R: Fc diseñado para aliviar la agregación de proteína expresada mientras se mantiene la actividad de unión a BAFF. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, clones que codifican para las secuencias de aminoácidos de JST661 (SEQ ID N.º: 17), JST662 (SEQ ID N.º: 18), JST663 (SEQ ID N.º: 19), JST673 (SEQ ID N.º: 20), JST674 (SEQ ID N.º: 21), JST675 (SEQ ID N.º: 22), JST672 (SEQ ID N.º: 23), JST676 (SEQ ID N.º: 24), JST671 (SEQ ID N.º: 25), JST677 (SEQ ID N.º: 26) y JST678 (SEQ ID N.º: 27). Otras realizaciones incluyen mutantes que codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc que tiene características de agregación similares al polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc nativo humano, pero también se une a BAFF, incluyendo, por ejemplo, secuencias que comprenden las secuencias de aminoácidos de JST659 (SEQ ID N.º: 15), JST660 (SEQ ID N.º: 16), JST664 (SEQ ID N.º: 28), JST668 (SEQ ID N.º: 29), JST665 (SEQ ID N.º: 30), JST666 (SEQ ID N.º: 31) y JST667 (SEQ ID N.º: 32). Otras realizaciones incluyen mutantes que codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc en el que se cambian aminoácidos conservados entre BAFF-R humano y de ratón por otros aminoácidos conservados y en el que se conserva la actividad de unión del polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc a BAFF. En otras realizaciones, los mutantes codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc que tiene aminoácidos que no están conservados entre BAFF-R humano y de ratón que se han cambiado por otros aminoácidos. Preferiblemente, se cambia al menos un aminoácido no polar por un residuo de prolina o un aminoácido polar no cargado.

### Antisentido

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a moléculas de ácido nucleico antisentido aisladas que pueden hibridarse con, o son complementarias a, la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la figura 2A, C, 3 o, o fragmentos, análogos o derivados de la misma. Un ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "sentido" que codifica para una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc de cadena doble o complementaria a una secuencia de ARNm. En aspectos específicos, se describen moléculas de ácido nucleico antisentido, que comprenden una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 10, 25, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos o una cadena que codifica para BAFF-R entera, o sólo a una parte de la misma. Adicionalmente se describen moléculas de ácido nucleico que codifican para fragmentos, homólogos, derivados y análogos de una proteína BAFF-R de cualquiera de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o ácidos nucleicos antisentido complementarios a una secuencia de ácido nucleico de BAFF-R de cualquiera de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6).

Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido frente a una "región codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica para BAFF-R. El término "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en residuos de aminoácidos (por ejemplo, la región que codifica para la proteína de BAFF-R humano corresponde a los nucleótidos de 13 a 568 de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), o los nucleótidos de 13 a 565 de la figura 2C (SEQ ID N.º: 4) o los nucleótidos de 298 a 849 de la figura 3 (SEQ ID N.º: 6)). La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido frente a una "región no codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica para BAFF-R. El término "región no codificante" se refiere a secuencias en 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (es decir, también denominadas regiones no traducidas en 5' y 3').

Dadas las secuencias de cadena codificante que codifican para BAFF-R descritas en el presente documento, pueden diseñarse ácidos nucleicos antisentido de la invención según las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick o Hoogsteen. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a toda la región codificante de ARNm de BAFF-R, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido sólo frente a una parte de la región codificante o no codificante de ARNm de BAFF-R. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de ARNm de BAFF-R. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido puede construirse usando reacciones de ligación enzimática o de síntesis química usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina.

Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen: 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el que se ha

subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

5 Las moléculas de ácido nucleico antisentido se pueden administrar a un sujeto o generar *in situ* de tal manera que se hibridan con, o se unen a, ARNm celular y/o ADN genómico que codifica para una proteína BAFF-R para así inhibir la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede realizarse mediante complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a un dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en el sitio del tejido. Alternativamente, pueden modificarse moléculas de ácido nucleico antisentido para seleccionar como diana células seleccionadas y luego administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, pueden modificarse moléculas antisentido de tal manera que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, enlazando las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores o antígenos de superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden administrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de moléculas antisentido, se prefieren constructos de vectores en los que se coloca la molécula de ácido nucleico antisentido bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

20 La molécula de ácido nucleico antisentido descrita en el presente documento puede ser una molécula de ácido nucleico a-anomérica. Una molécula de ácido nucleico a-anomérica forma híbridos de cadena doble específicos con ARN complementario en los que, al contrario que las unidades b habituales, las cadenas son paralelas entre sí (Gaultier *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.* (1987) FEBS Lett. 215: 327-330).

#### 25 **Ribozimas y restos de PNA**

Un ácido nucleico antisentido puede ser una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que pueden escindir un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un ARNm, frente al cual tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334: 585-591)) pueden usarse para escindir catalíticamente transcritos de ARNm de BAFF-R para así inhibir la traducción de ARNm de BAFF-R. Puede diseñarse una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica para BAFF-R basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADN de BAFF-R descrito en el presente documento (es decir, SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 6). Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia de nucleótidos del centro activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que va a escindirse en un ARNm que codifica para BAFF-R. Véase, por ejemplo, patente estadounidense de Cech *et al.* número 4.987.071; y patente estadounidense de Cech *et al.* número 5.116.742. Alternativamente, puede usarse ARNm de BAFF-R para seleccionar un ARN catalítico que tiene actividad de ribonucleasa específica a partir de una combinación de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel *et al.*, (1993) Science 261: 1411-1418.

40 Alternativamente, la expresión del gen de BAFF-R puede inhibirse seleccionando como diana secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de BAFF-R (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de BAFF-R) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen de BAFF-R en células diana. Véase generalmente, Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6: 569-84; Helene *et al.* (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; y Maher (1992) Bioassays 14: 807-15.

45 Los ácidos nucleicos de BAFF-R en el resto de base, resto de azúcar o esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, puede modificarse el esqueleto de desoxirribosa fosfato de los ácidos nucleicos para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup *et al.* (1996) Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23). Tal como se usan en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA" se refieren a compuestos miméticos de ácidos nucleicos, por ejemplo, compuestos miméticos de ADN, en los que el esqueleto de desoxirribosa fosfato se sustituye por un esqueleto pseudopeptídico y sólo se conservan las cuatro nucleobases naturales. Se ha demostrado que el esqueleto neutro de los PNA permite la hibridación específica con ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA puede realizarse usando protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida habituales tal como se describe en Hyrup *et al.* (1996) Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675.

55 Pueden usarse PNA de BAFF-R en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, pueden usarse PNA como agentes antisentido o antígenos para la modulación específica de secuencias de la expresión génica, por ejemplo, induciendo la detención de la transcripción o traducción o inhibiendo la replicación. También pueden usarse PNA de BAFF-R, por ejemplo, en el análisis de mutaciones de pares de bases únicos en un gen, por ejemplo, mediante PCR con abrazadera dirigido a PNA; como enzimas de restricción artificiales cuando se usan en combinación con otras enzimas, por ejemplo, nucleasas S1 (Hyrup B. (1996) Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23); o como

sondas o cebadores para la secuenciación e hibridación de ADN (Hyrup *et al.* (1996), *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23; Perry-O'Keefe (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675).

5 Los PNA de BAFF-R, por ejemplo, para potenciar su estabilidad o captación celular, uniendo grupos lipófilos o cooperadores de otro tipo a PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de administración de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras de PNA-ADN de BAFF-R que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permiten que enzimas de reconocimiento de ADN, por ejemplo, ARNasa H y ADN polimerasas, interaccionen con la parte de ADN mientras que la parte de PNA proporcionará una alta especificidad y afinidad de unión. Las quimeras de PNA-ADN pueden unirse usando ligadores de longitudes apropiadas seleccionados en cuanto al apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases y orientación (Hyrup (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23). La síntesis de quimeras de PNA-ADN puede realizarse tal como se describe en Hyrup (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5-23; y Finn *et al.* (1996) *Nucl. Acids Res.* 24: 3357-63. Por ejemplo, puede sintetizarse una cadena de ADN sobre un soporte sólido usando química de acoplamiento de fosforamidita habitual y análogos de nucleósidos modificados, por ejemplo, puede usarse 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita entre el PNA y el extremo 5' de ADN (Mag *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 5973-88). Entonces se acoplan monómeros de PNA de manera gradual para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA en 5' y un segmento de ADN en 3' (Finn *et al.* (1996) mencionado anteriormente). Alternativamente, pueden sintetizarse moléculas quiméricas con un segmento de ADN en 5' y un segmento de PNA en 3'. Véase, Petersen *et al.* (1975) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124.

20 Los oligonucleótidos pueden incluir otros grupos agregados tales como péptidos (por ejemplo, para seleccionar como diana receptores de célula huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 648-652; publicación PCT número WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT número WO 89/10134). Además, pueden modificarse oligonucleótidos con agentes de escisión activada por hibridación (véase, por ejemplo, Krol *et al.*, (1988) *BioTechniques* 6: 958-976) o agentes de intercalado (véase, por ejemplo, Zon, (1988) *Pharm. Res.* 5: 539-549). Con este fin, puede conjugarse el oligonucleótido con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación activada por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión activada por hibridación, etc.

### Polipéptidos BAFF-R

30 Un aspecto de la invención se refiere a proteínas BAFF-R aisladas y partes biológicamente activas de las mismas, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de las mismas para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R. También se proporcionan fragmentos de polipéptido adecuados para su uso como inmunógenos para preparar anticuerpos anti-BAFF-R. En una realización, pueden aislarse proteínas BAFF-R nativas a partir de células o fuentes de tejidos mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas habituales. En otra realización, las proteínas BAFF-R se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, puede sintetizarse químicamente un polipéptido o proteína BAFF-R usando técnicas de síntesis de péptidos habituales.

40 Una proteína "aislada" o "purificada" o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos de la que se deriva la proteína BAFF-R, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína BAFF-R en las que la proteína está separada de componentes celulares de las células de las que se aísla o produce de manera recombinante. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína BAFF-R que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteína distinta de BAFF-R (también denominada en el presente documento como "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de proteína distinta de BAFF-R, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de proteína distinta de BAFF-R y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de proteína distinta de BAFF-R. Cuando se produce de manera recombinante la proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma, preferiblemente también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% del volumen de la preparación de proteína.

55 La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de proteína BAFF-R en las que la proteína está separada de los precursores químicos u otras sustancias químicas que están implicadas en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de proteína BAFF-R que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de precursores químicos o sustancias químicas distintas de BAFF-R, más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de precursores químicos o sustancias químicas distintas de BAFF-R, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de precursores químicos o sustancias químicas distintas de BAFF-R y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de precursores químicos o sustancias químicas distintas de BAFF-R.

Las partes biológicamente activas de una proteína BAFF-R incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos lo suficientemente homólogas a, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína BAFF-R, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N.º: 5 que incluye menos aminoácidos que las proteínas BAFF-R de longitud completa y muestran al menos una actividad de una proteína BAFF-R. Normalmente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína BAFF-R. Una parte biológicamente activa de una proteína BAFF-R puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud.

Una parte biológicamente activa de una proteína BAFF-R de la presente invención puede contener al menos uno de los dominios identificados anteriormente conservados entre las proteínas BAFF-R. Una parte biológicamente activa alternativa de una proteína BAFF-R puede contener al menos dos de los dominios identificados anteriormente. Otra parte biológicamente activa de una proteína BAFF-R puede contener al menos tres de los dominios identificados anteriormente. Aún otra parte biológicamente activa de una proteína BAFF-R de la presente invención puede contener al menos cuatro de los dominios identificados anteriormente.

Además, pueden prepararse otras partes biológicamente activas, en las que se delecionan otras regiones de la proteína, mediante técnicas recombinantes y evaluarse para detectar una o más de las actividades funcionales de una proteína BAFF-R nativa.

En una realización, la proteína BAFF-R tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2D (SEQ ID N.º: 5). En otras realizaciones, la proteína BAFF-R es sustancialmente homóloga a la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) y conserva la actividad funcional de la proteína de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5), aunque se diferencia en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis o variación alélica natural, tal como se describe en detalle a continuación. En consecuencia, en otra realización, la proteína BAFF-R es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos homóloga en al menos aproximadamente un 45% a la secuencia de aminoácidos de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) y conserva la actividad funcional de las proteínas BAFF-R de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5).

En algunas realizaciones, la invención incluye mutantes específicos de polipéptido BAFF-R: Fc diseñados para aliviar la agregación de proteína expresada mientras conservan la actividad de unión a BAFF. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, clones que codifican para las secuencias de aminoácidos de JST661 (SEQ ID N.º: 17), JST662 (SEQ ID N.º: 18), JST663 (SEQ ID N.º: 19), JST673 (SEQ ID N.º: 20), JST674 (SEQ ID N.º: 21), JST675 (SEQ ID N.º: 22), JST672 (SEQ ID N.º: 23), JST676 (SEQ ID N.º: 24), JST671 (SEQ ID N.º: 25), JST677 (SEQ ID N.º: 26) y JST678 (SEQ ID N.º: 27). Otras realizaciones incluyen mutantes que codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc que tiene características de agregación similares a polipéptido BAFF-R R o BAFF-R: Fc humano nativo, pero también se unen a BAFF, incluyendo, por ejemplo, secuencias que comprenden las secuencias de aminoácidos de JST659 (SEQ ID N.º: 15), JST660 (SEQ ID N.º: 16), JST664 (SEQ ID N.º: 28), JST668 (SEQ ID N.º: 29), JST665 (SEQ ID N.º: 30), JST666 (SEQ ID N.º: 31) y JST667 (SEQ ID N.º: 32). Otras realizaciones incluyen mutantes que codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc en el que se cambian aminoácidos conservados entre BAFF-R humano y de ratón por otros aminoácidos conservados y en los que se conserva la actividad de unión de polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc a BAFF. En otras realizaciones, los mutantes codifican para un polipéptido BAFF-R o BAFF-R: Fc que tiene aminoácidos que no están conservados entre BAFF-R humano y de ratón que se han cambiado por otros aminoácidos. Preferiblemente, se mutan aminoácidos no polares por prolina o aminoácidos polares no cargados.

#### 40 **Determinación de homología entre dos o más secuencias**

Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esa posición (es decir, tal como se usa en el presente documento, la "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico).

La homología de secuencia de ácido nucleico puede determinarse como el grado de identidad entre dos secuencias. La homología puede determinarse usando programas informáticos conocidos en la técnica, tales como el software GAP proporcionado en el paquete de programas del GCG. Véase Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453. Usando el software GAP del GCG con los siguientes parámetros para la comparación de secuencias de ácido nucleico: penalización por creación de hueco de 5,0 y penalización por extensión de hueco de 0,3, la región codificante de las secuencias de ácido nucleico análogas a las que se hizo referencia anteriormente muestra preferiblemente un grado de identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o el 99%, con la parte CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6).

El término "identidad de secuencia" se refiere al grado en el que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son idénticas basándose en cada residuo a lo largo de una región particular de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las que se producen bases de ácido nucleico idénticas (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I, en el caso de ácidos nucleicos) en ambas secuencias para dar el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de intervalo) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento representa una característica de una secuencia de polinucleótidos, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento y a menudo una identidad de secuencia del 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de menos el 99 por ciento comparado con una secuencia de referencia a lo largo de una región de comparación.

### Proteínas de fusión y quiméricas

La invención también proporciona proteínas de fusión o quiméricas de BAFF-R. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" de BAFF-R comprende un polipéptido BAFF-R operativamente unido a un polipéptido distinto de BAFF-R. Un "polipéptido BAFF-R" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a BAFF-R, mientras que un "polipéptido distinto de BAFF-R" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la proteína BAFF-R, por ejemplo, una proteína que es diferente de la proteína BAFF-R y que se deriva del mismo organismo o uno diferente. En una proteína de fusión de BAFF-R el polipéptido BAFF-R puede corresponder a toda o una parte de la proteína BAFF-R. En una realización, una proteína de fusión de BAFF-R comprende al menos una parte biológicamente activa de una proteína BAFF-R. En otra realización, una proteína de fusión de BAFF-R comprende al menos dos partes biológicamente activas de una proteína BAFF-R. Aún en otra realización, una proteína de fusión de BAFF-R comprende al menos tres partes biológicamente activas de una proteína BAFF-R. En la proteína de fusión, se pretende que el término "operativamente unido" indique que el polipéptido BAFF-R y el polipéptido distinto de BAFF-R estén fusionados en marco entre sí. El polipéptido distinto de BAFF-R puede fusionarse con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del polipéptido BAFF-R. El polipéptido distinto de BAFF-R puede ser, por ejemplo, la parte Fc de un anticuerpo. Éste puede estar operativamente unido o bien al extremo N-terminal o bien al extremo C-terminal del polipéptido BAFF-R. Se han descrito fusiones de Fc-proteína diana en Lo *et al.* (1998) *Protein Engineering* 11: 495-500 y las patentes estadounidenses números 5.541.087 y 5.726.044.

Por ejemplo, en una realización una proteína de fusión de BAFF-R comprende un dominio de BAFF-R operativamente unido al dominio extracelular con el dominio extracelular de una segunda proteína. Tales proteínas de fusión pueden utilizarse adicionalmente en ensayos de selección para detectar compuestos que modulan la actividad de BAFF-R (tales ensayos se describen en detalle a continuación).

En otra realización más, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-BAFF-R en la que las secuencias de BAFF-R están fusionadas con el extremo C-terminal de las secuencias de GST (es decir, glutatión S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de BAFF-R recombinante.

En otra realización, la proteína de fusión es una proteína BAFF-R que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. Por ejemplo, ya que BAFF-R no contiene su propia secuencia señal, debe fusionarse una secuencia señal heteróloga en el extremo 5' de la secuencia que codifica para BAFF-R para una secreción eficaz de la proteína de fusión de BAFF-R. Puede aumentarse la expresión y/o secreción de BAFF-R mediante el uso de secuencias señal heterólogas diferentes.

En otra realización más, la proteína de fusión es una proteína de fusión de BAFF-R-inmunoglobulina en la que las secuencias de BAFF-R que comprenden uno o más dominios están fusionadas con secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión de BAFF-R-inmunoglobulina de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando de BAFF-R y una proteína BAFF-R sobre la superficie de una célula, para así suprimir la transducción de señales mediada por BAFF-R *in vivo*. Pueden usarse las proteínas de fusión de BAFF-R-inmunoglobulina para alterar la biodisponibilidad de un ligando relacionado con BAFF-R. La inhibición de la interacción ligando de BAFF-R/BAFF-R puede ser terapéuticamente útil tanto para el tratamiento de trastornos proliferativos y diferenciativos, así como para la modulación (por ejemplo estimulación o inhibición) de la supervivencia celular. Además, las proteínas de fusión de BAFF-R-inmunoglobulina de la invención pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos anti-BAFF-R en un sujeto, para purificar ligandos de BAFF-R y en ensayos de selección para identificar moléculas que inhiben la interacción de BAFF-R con un ligando de BAFF-R.

Una proteína de fusión o quimérica de BAFF-R de la invención puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante habituales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntos en marco según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos terminales romos o cohesivos para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales

apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. En otra realización, puede sintetizarse el gen de fusión mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden aparearse posteriormente y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* Eds. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, hay muchos vectores de expresión comercialmente disponibles que ya codifican para un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Puede clonarse un ácido nucleico que codifica para BAFF-R en un vector de expresión de este tipo de manera que el resto de fusión está unido en marco con la proteína BAFF-R.

En una realización preferida, la fusión de BAFF-R se proporciona por las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID N.º: 11) y de aminoácidos (SEQ ID N.º: 12) de la figura 9.

### Antagonistas y agonistas de BAFF-R

La presente invención también se refiere a variantes de las proteínas BAFF-R que funcionan o bien como agonistas (miméticos) de BAFF-R o bien como antagonistas de BAFF-R. Pueden generarse variantes de la proteína BAFF-R mediante mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual diferenciada o truncamiento de la proteína BAFF-R. Un agonista de la proteína BAFF-R puede conservar sustancialmente las mismas, o un subconjunto de las, actividades biológicas de la forma que se produce de manera natural de la proteína BAFF-R. Un antagonista de la proteína BAFF-R puede inhibir una o más de las actividades la forma que se produce de manera natural de la proteína BAFF-R, por ejemplo, uniéndose competitivamente a un miembro anterior o posterior de una cascada de señalización celular que incluye la proteína BAFF-R. Por tanto, pueden provocarse efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma que se produce de manera natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma que se produce de manera natural de las proteínas BAFF-R.

Pueden identificarse variantes de la proteína BAFF-R que funcionan o bien como agonistas (miméticos) de BAFF-R o bien como antagonistas de BAFF-R mediante exploración de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, de la proteína BAFF-R para detectar actividad agonista o antagonista de proteína BAFF-R. En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes de BAFF-R mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y se codifica por una biblioteca de genes variegada. Puede producirse una biblioteca variegada de variantes de BAFF-R, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal manera que pueden expresarse un conjunto degenerado de posibles secuencias de BAFF-R como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para presentación de fagos) que contiene el conjunto de secuencias de BAFF-R en el mismo. Hay una variedad de procedimientos que pueden usarse para producir bibliotecas de posibles variantes de BAFF-R a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Puede realizarse la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador de ADN automático y entonces ligarse el gen sintético en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto de genes degenerados permite proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican para el conjunto deseado de posibles secuencias de BAFF-R. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Narang (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura *et al.* (1984) Ann. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura *et al.* (1977) Science 198: 1056-1063; Ike *et al.* (1983) Nucl. Acids Res. 11: 477-488.

### Bibliotecas de polipéptidos

Además, pueden usarse bibliotecas de fragmentos de la secuencia que codifica para proteína BAFF-R para generar una población variegada de fragmentos de BAFF-R para la exploración y posterior selección de variantes de una proteína BAFF-R. En una realización, puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencia codificante tratando un fragmento de PCR de cadena doble de una secuencia que codifica para BAFF-R con una nucleasa en condiciones en las que el mellado se produce sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de cadena doble, renaturalizando el ADN para formar ADN de cadena doble que incluye pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminando las partes de cadena sencilla de los dúplex que han vuelto a formarse mediante tratamiento con nucleasa S1 y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica para fragmentos internos y N-terminales de diversos tamaños de la proteína BAFF-R.

En la técnica se conocen varias técnicas para la selección de productos de genes de bibliotecas combinatorias preparadas mediante mutaciones puntuales o truncamiento y para la exploración de bibliotecas de ADNc para seleccionar productos de genes que tienen una propiedad seleccionada. Tales técnicas pueden adaptarse para una exploración rápida de las bibliotecas de genes generadas mediante mutagénesis combinatoria de proteínas BAFF-R. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para la exploración de grandes bibliotecas de genes incluyen clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en

condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica para el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una nueva técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de selección para identificar variantes de BAFF-R (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) Protein Engineering 6: 327-331).

### Anticuerpos anti-BAFF-R

Una proteína BAFF-R aislada, o una parte o fragmento de la misma, puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a BAFF-R usando técnicas habituales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede usarse la proteína BAFF-R de longitud completa o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos de péptido antigénico de BAFF-R para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de BAFF-R comprende al menos 8 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) y abarca un epítipo de BAFF-R de tal manera que un anticuerpo preparado frente al péptido forma un complejo inmunitario específico con BAFF-R. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 residuos de aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácidos; y lo más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácidos. Los epítipos preferidos abarcados por el péptido antigénico son las regiones de BAFF-R que están ubicadas sobre la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas.

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de proteína BAFF-R de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5), o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma, pueden utilizarse como inmunógenos en la generación de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a estos componentes de proteína. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno, tal como BAFF-R. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> y una biblioteca de expresión de Fab. En una realización específica, se describen anticuerpos frente a proteínas BAFF-R humanas. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a una secuencia de proteína BAFF-R de la figura 2D (SEQ ID N.º: 5) o derivado, fragmento, análogo u homólogo de la misma. Algunas de estas proteínas se describen a continuación.

Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse diversos animales huésped adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) mediante inyección con la proteína nativa, o una variante sintética de la misma, o un derivado de lo anterior. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, proteína BAFF-R expresada de manera recombinante o un polipéptido BAFF-R sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante. Diversos adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, dinitrofenol, etc.), adyuvantes humanos tales como bacilo Calmette-Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimulantes similares. Si se desea, pueden aislarse las moléculas de anticuerpo dirigidas frente a BAFF-R del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía con proteína A para obtener la fracción de IgG.

El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular de BAFF-R. Por tanto, una composición de anticuerpo monoclonal presenta normalmente una única afinidad de unión para una proteína BAFF-R particular con la que inmunorreacciona. Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a una proteína BAFF-R particular, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante cultivo continuo de línea celular. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma (véase Kohler & Milstein, (1975) Nature 256: 495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor *et al.* (1983) Immunol. Today 4: 72) y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.* en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos en la práctica de la presente invención y pueden producirse usando hibridomas humanos (véase Cote *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus Epstein-Barr *in vitro* (véase Cole *et al.* en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985 págs. 77-96). Según la invención, pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos frente a una proteína BAFF-R (véase por ejemplo, patente estadounidense número 4.946.778). Además, pueden adaptarse procedimientos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase por ejemplo, Huse *et al.* (1989) Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada frente a una proteína BAFF-R o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Pueden "humanizarse" anticuerpos no humanos mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 5.225.539. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos frente a una proteína BAFF-R mediante técnicas conocidas en

la técnica incluyendo, pero sin limitarse a: (i) un fragmento F(ab')<sub>2</sub> producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado mediante reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>; (iii) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos Fv.

- 5 Adicionalmente, los anticuerpos anti-BAFF-R recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos, que comprenden partes tanto humanas como no humanas, que pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante habituales, están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando procedimientos descritos en la solicitud internacional PCT número PCT/US86/02269; la solicitud de  
10 patente europea número 184.187; la solicitud de patente europea número 171.496; la solicitud de patente europea número 173.494; publicación internacional PCT número WO 86/01533; patente estadounidense número 4.816.567; la solicitud de patente europea número 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47: 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446-449;  
15 Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4: 214; patente estadounidense número 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

En una realización, los procedimientos para la selección de anticuerpos que presentan la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas de  
20 manera inmunológica conocidas en la técnica. En una realización específica, se facilita la selección de anticuerpos que son específicos frente a un dominio particular de una proteína BAFF-R mediante la generación de hibridomas que se unen al fragmento de una proteína BAFF-R que presenta un dominio de este tipo. En el presente documento también se proporcionan anticuerpos que son específicos frente a uno o más dominios dentro de una proteína BAFF-R, por ejemplo, dominios que se extienden sobre las regiones conservadas identificadas anteriormente de  
25 proteínas de la familia BAFF-R, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de las mismas.

Pueden usarse anticuerpos anti-BAFF-R en procedimientos conocidos en la técnica referentes a la localización y/o cuantificación de una proteína BAFF-R (por ejemplo, para el uso en la medición de niveles de la proteína BAFF-R en  
muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en procedimientos de diagnóstico, para su uso en formación de imágenes de la proteína y similares). En una realización dada, se utilizan anticuerpos frente a proteínas BAFF-R, o  
30 derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo, que contienen el dominio de unión derivado de anticuerpo, como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo en el presente documento "agentes terapéuticos").

Puede usarse un anticuerpo anti-BAFF-R (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar BAFF-R mediante técnicas habituales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-BAFF-R puede  
35 facilitar la purificación de BAFF-R natural a partir de células y de BAFF-R producido de manera recombinante expresado en células huésped. Además, puede usarse un anticuerpo anti-BAFF-R para detectar proteína BAFF-R (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y patrón de expresión de la proteína BAFF-R. Pueden usarse anticuerpos anti-BAFF-R a modo de diagnóstico para monitorizar niveles de proteína en tejidos como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar  
40 la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante acoplamiento (es decir, unión física) del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen las peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, o acetilcolina esterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminafluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H.

#### **Vectores de expresión recombinante de BAFF-R y células huésped**

Otro aspecto de la invención está relacionado con vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para la proteína BAFF-R, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la  
50 misma. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido," que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular al que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores pueden  
55 realizar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores pueden  
60 dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión." En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN

recombinante a menudo están en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus con defectos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), pueden servir para funciones equivalentes.

5 Los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas partiendo de la base de las células huésped que van a usarse para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Dentro de un factor de expresión recombinante, “unido operativamente”  
10 pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). Se pretende que el término “secuencia reguladora” incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en  
15 Goeddel “Gene Expression Technology” METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteínas deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención  
20 pueden introducirse en las células huésped para producir así proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, proteínas BAFF-R, formas mutantes de BAFF-R, proteínas de fusión, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de BAFF-R en células  
25 procariontas o eucariotas. Por ejemplo, BAFF-R puede expresarse en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus) células de levaduras o células de mamífero. Las células huésped adecuadas se tratan adicionalmente en Goeddel, “Gene Expression Technology” METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990. Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando las secuencias reguladoras del promotor  
30 de T7 y la polimerasa de T7.

La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo lo más frecuentemente en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada en ellos, normalmente al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión normalmente sirven para tres fines: (1) aumentar la  
35 expresión de proteína recombinante; (2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión posteriormente a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento análogas, incluyen  
40 Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa E, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión, inducibles, adecuados incluyen pTrc (Amrann *et al.*,  
45 (1988) Gene 69: 301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, “Gene Expression Technology” METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academia Press, San Diego, Calif., 1990, págs. 60-89). Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad afectada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, Gottesman, “Gene Expression Technology  
50 “METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, págs. 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que va a insertarse en un vector de expresión, de modo que los codones individuales para cada aminoácido son los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada *et al.*, (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118). Una alteración de este tipo de las secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

El vector de expresión de BAFF-R puede ser un vector de expresión de levaduras. Ejemplos de vectores para la  
55 expresión en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) incluyen pYepSec1 (Baldari, *et al.*, (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), y para *P. pastoris* incluyen la familia de vectores pPIC (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, BAFF-R puede expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus.  
60 Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto en cultivo (por ejemplo,

células SF9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.*(1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170: 31-39).

Un ácido nucleico puede expresarse en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840-842) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usa en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión a menudo se proporcionan mediante elementos de regulación viral. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se derivan de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, véase, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

El vector de expresión de mamífero recombinante puede ser capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Se conocen en la técnica elementos reguladores específicos de tejido. Ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de la albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.* (1987) Genes Dev. 1: 268-277), los promotores específicos del tejido linfoide (Calame y Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275), en particular los promotores de los receptores de las células T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729-733) y las inmunoglobulinas (Banerji *et al.* (1983) Cell 33: 729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), los promotores específicos de las neuronas (por ejemplo, el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477), los promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.* (1985) Science 230: 912-916), y los promotores específicos de las glándulas mamarias (por ejemplo, el promotor del suero de la leche; patente estadounidense número 4.873.316 y publicación de solicitud europea número 264.166). También se engloban los promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, los promotores de los genes *hox* murinos (Kessel y Gruss (1990) Science 249: 374-379) y el promotor de la  $\alpha$ -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546).

También se ha descrito en el presente documento un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia reguladora de una manera que se permita la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto al ARNm de BAFF-R. Las secuencias reguladoras unidas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido pueden escogerse para que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos celulares, por ejemplo promotores y/o potenciadores virales, o las secuencias reguladoras pueden escogerse para que dirijan la expresión constitutiva, expresión específica de tejido o específica del tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un virus atenuado, fagémido o plásmido recombinante, en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede determinarse por el tipo celular en el que se introduce el vector. Para tratar la regulación de la expresión génica usando genes antisentido, véase Weintraub *et al.* (1986) "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews-Trends in Genetics, 1(1).

Otro aspecto descrito en el presente documento está relacionado con las células huésped en las que se ha introducido un factor de expresión recombinante de la invención. Las expresiones "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se entiende que tales expresiones se refieren no sólo a la célula objeto particular, sino a la progenie o a la posible progenie de tal célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones subsiguientes debido o bien a mutación o bien a influencias medioambientales, puede que tal progenie no sea idéntica de hecho a la célula original, pero todavía se incluya dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, la proteína BAFF-R puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levaduras o células de mamífero (tales como las células de ovario del hámster chino (CHO) o las células COS). Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

El ADN del vector puede introducirse en las células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los términos "transformación" y "transfección" se refieran a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o con cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Pueden encontrarse procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y en otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de las células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de

interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para BAFF-R o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula huésped, tal como una célula huésped procarionta o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) proteína BAFF-R. En consecuencia, se han descrito en el presente documento procedimientos para producir proteína BAFF-R usando las células huésped. El procedimiento puede comprender poner en cultivo la célula huésped (en la que se ha introducido un factor de expresión recombinante que codifica para BAFF-R) en un medio adecuado, de manera que se produce la proteína BAFF-R. El procedimiento puede comprender además aislar BAFF-R del medio o de la célula huésped.

### Animales transgénicos

Las células huésped también pueden usarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, una célula huésped puede ser un ovocito fertilizado o una célula madre embrionaria en la que se han introducido secuencias codificantes para BAFF-R. Tales células huésped pueden usarse entonces para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias exógenas de BAFF-R en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado las secuencias endógenas de BAFF-R. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o la actividad de BAFF-R y para identificar y/o evaluar los moduladores de la actividad de BAFF-R. Tal como se usa en el presente documento, un "animal transgénico" es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un roedor tal como una rata o un ratón, en el que una o más de las células del animal incluyen un transgén. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un transgén es ADN exógeno que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo así la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico. Tal como se usa en el presente documento, un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ratón, en el que se ha alterado un gen de BAFF-R endógeno mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógena introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Un animal transgénico puede crearse mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica para BAFF-R en los pronúcleos masculinos de un ovocito fertilizado, por ejemplo, mediante microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal de acogida hembra pseudopreñado. La secuencia de ADN de BAFF-R humano de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) puede introducirse como un transgén en el genoma de un animal no humano. Alternativamente, un homólogo no humano del gen de BAFF-R humano, tal como un gen de BAFF-R de ratón (figura 4A) (SEQ ID N.º: 8), puede aislarse basándose en la hibridación con el ADNc de BAFF-R humano (descrito adicionalmente antes) y usarse como un transgén. También pueden incluirse en el transgén secuencias intrónicas y señales de poliadenilación para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Una(s) secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejido puede(n) estar unida(s) operativamente al transgén de BAFF-R para dirigir la expresión de la proteína BAFF-R en células particulares. Los procedimientos para generar animales transgénicos mediante manipulación embrionaria y microinyección, particularmente animales tales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 4.736.866; 4.870.009; y 4.873.191; y Hogan en MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986. Se usan procedimientos similares para la producción de otros animales transgénicos. Puede identificarse un animal fundador transgénico basándose en la presencia del transgén de BAFF-R en su genoma y/o en la expresión del ARNm de BAFF-R en los tejidos o células de los animales. Puede usarse entonces un animal fundador transgénico para criar animales adicionales que llevan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un transgén que codifica para BAFF-R pueden criarse adicionalmente para dar lugar a otros animales transgénicos que llevan otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene al menos una parte de un gen de BAFF-R en el que se ha introducido una delección, adición o sustitución para alterar así, por ejemplo, para afectar funcionalmente, al gen de BAFF-R. El gen de BAFF-R puede ser un gen humano (por ejemplo, figura 2A (SEQ ID N.º: 3), figura 2C (SEQ ID N.º: 4), figura 3 (SEQ ID N.º: 6)), pero más preferiblemente, es un homólogo no humano de un gen humano de BAFF-R. Por ejemplo, puede usarse un homólogo de ratón (figura 4a) del gen humano de BAFF-R de la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2C (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) para construir un vector de recombinación homóloga adecuada para alterar un gen endógeno de BAFF-R en el genoma del ratón. El vector se puede diseñar de manera que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno de BAFF-R resulta funcionalmente afectado (es decir, ya no codifica para una proteína funcional; también se denomina vector "deficiente").

Alternativamente, el vector puede diseñarse de manera que, tras la recombinación homóloga, el gen de BAFF-R endógeno se muta o se altera de otra forma, pero todavía codifica para la proteína funcional (por ejemplo, la región

reguladora en sentido de 5' puede alterarse para alterar así la expresión de la proteína BAFF-R endógena). En el vector de recombinación homóloga, la parte alterada del gen de BAFF-R está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por el ácido nucleico adicional del gen de BAFF-R para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen de BAFF-R exógeno portado por el vector y un gen de BAFF-R endógeno en una célula madre embrionaria. El ácido nucleico flanqueante adicional de BAFF-R es de longitud suficiente como para la recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno. Normalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el 3'). Véase por ejemplo, Thomas *et al.* (1987) Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen de BAFF-R introducido se recombina de manera homóloga con el gen de BAFF-R endógeno (véase por ejemplo, Li *et al.* (1992) Cell 69: 915).

Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación. Véase por ejemplo, Bradley, en TERATOCARCINOMAS Y EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, Ed. IRL, Oxford, 1987, págs. 113-152. Entonces puede implantarse un embrión quimérico en un animal de acogida hembra seudopreñado adecuado y el embrión se lleva a término. La progenie que alberga el ADN recombinado de manera homóloga en sus células reproductoras puede usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga mediante la transmisión de la línea germinal del transgén. Los procedimientos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen adicionalmente en Bradley (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; Publicaciones Internacionales PCT números: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; y WO 93/04169.

Pueden producirse animales no humanos transgénicos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de un sistema de este tipo es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriofago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa cre/loxP, véase, por ejemplo, Lakso *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *S. cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) Science 251: 1351-1355. Si se utiliza un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contienen transgenes que codifican tanto para la recombinasa Cre como para una proteína seleccionada. Tales animales pueden proporcionarse a través de la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, mediante el apareamiento de dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica para una proteína seleccionada y otro que contiene un transgén que codifica para una recombinasa.

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento también pueden producirse según los procedimientos descritos en Wilmut *et al.* (1997) Nature 385: 810-813. En resumen, puede aislarse una célula, por ejemplo, una célula somática, procedente del animal transgénico e inducirse para que salga del ciclo de crecimiento y entre en la fase Go. La célula quiescente puede fusionarse entonces, por ejemplo, mediante el uso de impulsos eléctricos, a un ovocito enucleado de un animal de la misma especie de la que se aísla la célula quiescente. El ovocito reconstruido se cultiva entonces de manera que se desarrolla hasta la fase de mórula o blastocito y entonces se transfiere al animal de acogida hembra seudopreñado. La progenie que da a luz este animal de acogida hembra será un clon del animal del que aísla la célula, por ejemplo, la célula somática.

### Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico de BAFF-R, las proteínas BAFF-R, y los anticuerpos anti-BAFF-R (también denominados en el presente documento "compuestos activos") de la invención, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Tales composiciones comprenden normalmente la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia habitual en el campo, que se incorpora al presente documento como referencia. Ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para los principios farmacéuticamente activos es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía deseada de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales

como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

- 5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (que son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que se pueda inyectar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del principio activo (por ejemplo, una proteína BAFF-R o un anticuerpo anti-BAFF-R) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son desecación a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado a partir de una solución que se ha filtrado previamente para hacer estéril la misma.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse para la preparación de comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el principio activo puede incorporarse con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un vehículo fluido para su uso como enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se borbotea y se expectora o se traga. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en forma de un pulverizador de aerosol desde un dispensador o recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede realizarse mediante medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica se utilizan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que va a permearse. Tales agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los principios activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales como manteca de cacao u otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto frente a la eliminación rápida del organismo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporación y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos contra células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense número 4.522.811.

Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para la forma farmacéutica unitaria de la invención viene determinada por y es directamente dependiente de las características únicas del principio activo y del efecto terapéutico particular que va a lograrse.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante cualquiera de varias vías, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense número 5.703.055. Por tanto, la administración también pueden incluir, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente estadounidense número 5.328.470) o inyección estereotáctica (véase por ejemplo, Chen *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebido el vehículo de administración génica. Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador, junto con instrucciones para la administración.

## Usos y procedimientos de la invención

Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteínas, y anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse en uno o más de los siguientes métodos: (a) ensayos de selección; (b) ensayos de detección (por ejemplo, mapeo cromosómico, tipificación tisular, biología forense), (c) medicina preventiva (por ejemplo, ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, ensayos clínicos de monitorización y farmacogenómica); y (d) procedimientos de tratamiento (por ejemplo, terapéuticos y profilácticos). Tal como se describe en el presente documento, en una realización, una proteína BAFF-R de la invención puede unirse a BAFF.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención pueden usarse para expresar la proteína BAFF-R (por ejemplo, mediante un vector de expresión recombinante en una célula huésped en aplicaciones de terapia génica), para detectar ARNm de BAFF-R (por ejemplo, en una muestra biológica) o una lesión genética en un gen de BAFF-R, y para modular la actividad de BAFF y/o BAFF-R, tal como se describe adicionalmente más adelante. Además, las proteínas BAFF-R pueden usarse para seleccionar fármacos o compuestos que modulan la actividad o la expresión de BAFF-R, así como para tratar trastornos caracterizados por la producción insuficiente o excesiva de la proteína BAFF y/o BAFF-R; o la producción de formas de la proteína BAFF-R que tienen actividad disminuida o aberrante en comparación con la proteína BAFF-R de tipo natural. Además, pueden usarse los anticuerpos anti-BAFF-R de la invención para detectar y aislar proteínas BAFF-R y para modular la actividad de BAFF y/o BAFF-R.

También se han descrito en el presente documento agentes novedosos identificados mediante los ensayos de selección descritos anteriormente y los usos de los mismos para los tratamientos, tal como se describe en el presente documento.

## Ensayos de selección

Se ha descrito en el presente documento un procedimiento (también denominado en el presente documento "ensayo de selección") para identificar moduladores, es decir, agentes o compuestos de prueba o candidatos (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, pequeñas moléculas u otros fármacos) que se unen a las proteínas BAFF-R o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre, por ejemplo, la expresión de BAFF-R o la actividad de BAFF-R.

Se han descrito en el presente documento ensayos para seleccionar compuestos de prueba o candidatos que se unen a o modulan la actividad de una proteína BAFF-R o polipéptido o parte biológicamente activo del mismo. Los compuestos de prueba de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en los procedimientos de biblioteca de combinación conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase de solución o fase sólida paralelas espacialmente dirigibles; procedimientos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; procedimiento de biblioteca de "una perla – un compuesto"; y procedimientos de biblioteca sintética usando selección mediante cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques pueden aplicarse a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145-167).

En la técnica, pueden encontrarse ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-6013; Erb *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Zuckermann *et al.* (1994) J Med. Chem. 37: 2678-2685; Cho *et al.* (1993) Science 261: 1303;

Carrell *et al.* (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell *et al.* (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233-1251.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), en chips (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias (patente estadounidense de Ladner número 5.223.409), esporas (patente estadounidense de Ladner 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390; Devlin (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; patente estadounidense de Ladner 5.223.409).

Un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa una forma unida a la membrana de la proteína BAFF-R, o una parte biológicamente activa de la misma, en la superficie de la célula se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba para unirse a una proteína BAFF-R determinada. La célula, por ejemplo, puede ser una célula de origen mamífero o de levadura. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para unirse a la proteína BAFF-R puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto de prueba con un radioisótopo o marcador enzimático, de manera que la unión del compuesto de prueba a la proteína BAFF-R o la parte biológicamente activa de la misma puede determinarse mediante la detección del compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden marcarse con <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, o <sup>3</sup>H, o bien directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse mediante el recuento directo de la radioemisión o mediante recuento por centelleo. Alternativamente, los compuestos de prueba pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático puede detectarse mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en el producto. el ensayo puede comprender poner en contacto una célula que expresa una forma unida a la membrana de la proteína BAFF-R, o una parte biológicamente activa de la misma, en la superficie de la célula con un compuesto conocido que se une a BAFF-R para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse preferentemente a BAFF-R o a una parte biológicamente activa de la misma en comparación con el compuesto conocido.

Un ensayo puede ser un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una forma unida a la membrana de la proteína BAFF-R, o una parte biológicamente activa de la misma, en la superficie de la célula con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de la proteína BAFF-R o la parte biológicamente activa de la misma. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de BAFF-R o una parte biológicamente activa de la misma puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad de la proteína BAFF-R para unirse a o interactuar con una molécula diana de BAFF-R. Tal como se usa en el presente documento, una "molécula diana" es una molécula con la que una proteína BAFF-R se une o interacciona en la naturaleza, por ejemplo, una molécula en la superficie de una célula que expresa una proteína BAFF-R, una molécula en la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada con la superficie interna de una membrana celular o una molécula citoplasmática. Una molécula diana de BAFF-R puede ser una molécula distinta de BAFF-R o una proteína o polipéptido BAFF-R. Una molécula diana de BAFF-R puede ser un componente de una ruta de transducción de señales que facilita la transducción de una señal extracelular (por ejemplo, una señal generada mediante la unión de un compuesto a una molécula BAFF-R unida a la membrana) a través de la membrana celular y hacia el interior de la célula. La diana, por ejemplo, puede ser una segunda proteína intercelular que tiene actividad catalítica o una proteína que facilita la asociación de moléculas de señalización posterior con BAFF-R

La determinación de la capacidad de la proteína BAFF-R para unirse a o interactuar con una molécula diana de BAFF-R puede llevarse a cabo mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente para determinar la unión directa. La determinación de la capacidad de la proteína BAFF-R para unirse o interactuar con una molécula diana de BAFF-R puede llevarse a cabo mediante la determinación de la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse mediante la detección de la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (es decir, Ca<sup>2+</sup> intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), la detección de la actividad catalítica / enzimática de la diana en un sustrato apropiado, la detección de la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador que responde a BAFF-R operativamente unido a un ácido nucleico que codifica para un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa), o la detección de una respuesta celular, por ejemplo, supervivencia célula, diferenciación celular, o proliferación celular.

Un ensayo puede ser un ensayo libre de células que comprende poner en contacto una proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse a la proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma. La unión del compuesto de prueba a la proteína BAFF-R puede determinarse o bien directa o bien indirectamente, tal como se describió anteriormente. El ensayo puede comprender poner en contacto la proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a BAFF-R para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de

ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse preferentemente a BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma en comparación con el compuesto conocido.

- 5 Un ensayo puede ser un ensayo libre de células que comprende poner en contacto la proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de la proteína BAFF-R o la parte biológicamente activa de la misma. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de BAFF-R puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad de la proteína BAFF-R para unirse a una
- 10 molécula diana de BAFF-R mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de BAFF-R puede llevarse a cabo mediante la determinación de la capacidad de la proteína BAFF-R para modular adicionalmente una molécula diana de BAFF-R. Por ejemplo, puede determinarse la actividad catalítica / enzimática de la molécula diana sobre un sustrato apropiado, tal como se describió anteriormente.
- 15 El ensayo libre de células puede comprender poner en contacto la proteína BAFF-R o parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a BAFF-R para formar un mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con una proteína BAFF-R comprende determinar la capacidad de la proteína BAFF-R para unirse
- 20 preferentemente o para modular la actividad de una molécula diana de BAFF-R.

Los ensayos libres de células descritos en el presente documento son susceptibles de usar tanto la forma soluble como la forma unida a la membrana de BAFF-R. En el caso de los ensayos libres de células que comprenden la forma unida a la membrana de BAFF-R, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante, de manera que la forma unida a la membrana de BAFF-R se mantenga en solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen

25 detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, isotridecilo(etilenglicol éter)<sub>n</sub>, sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilamminio-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilamminio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

- 30 En más de uno de los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento, puede ser deseable inmovilizar o bien BAFF-R o bien su molécula diana para facilitar la separación de formas complejas de las no complejas de una o ambas proteínas, así como adaptar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a BAFF-R, o la interacción de BAFF-R con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado que contenga los reactivos. Ejemplos de tales
- 35 recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión GST-BAFF-R o las proteínas de fusión GST-diana pueden adsorberse en perlas de glutatión-Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que entonces se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y o
- 40 bien la proteína diana no adsorbida o bien la proteína BAFF-R, y la mezcla se incuba en condiciones conductoras para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Tras la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas, el complejo se determina o bien directa o bien indirectamente, por ejemplo, tal como se describió anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de unión
- 45 o actividad de BAFF-R se determinan usando técnicas convencionales.

También pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices en los ensayos de selección. Por ejemplo, o bien BAFF-R o bien su molécula diana pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Las moléculas diana o BAFF-R biotiniladas pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals,

50 Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de las placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, anticuerpos reactivos con BAFF-R o moléculas dianas, pero que no interfieren con la unión de la proteína BAFF-R a su molécula diana, pueden derivatizarse a los pocillos de la placa, y la diana no unida o BAFF-R pueden quedar atrapados en los pocillos mediante la conjugación con anticuerpos. Procedimientos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen

55 la inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con BAFF-R o la molécula diana, así como ensayos unidos a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con BAFF-R o la molécula diana.

Se pueden identificar moduladores de la expresión de BAFF-R en un procedimiento en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm de BAFF-R o la proteína en la célula.

60 El nivel de expresión del ARNm de BAFF-R o la proteína en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm de BAFF-R o la proteína en ausencia del compuesto candidato. El compuesto

candidato puede identificarse entonces como un modulador de la expresión de BAFF-R basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm de BAFF-R o la proteína es mayor (mayor de manera estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión del ARNm de BAFF-R o de la proteína. Alternativamente, cuando

- 5 la expresión del ARNm de BAFF-R o la proteína es menor (menor de manera estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm de BAFF-R o de la proteína. El nivel de expresión del ARNm de BAFF-R o de la proteína en las células puede determinarse mediante los procedimientos descritos anteriormente para detectar el ARNm de BAFF-R o la proteína.
- 10 Las proteínas BAFF-R pueden usarse como "proteínas cebo" en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72: 223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14: 920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8: 1693-1696; y documento WO 94/10300 de), para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con BAFF-R ("proteínas de unión a BAFF-R" o "BAFF-R-bp") y modular la actividad de BAFF-R.
- 15 También es probable que tales proteínas de unión a BAFF-R participen en la propagación de señales por las proteínas BAFF-R, como, por ejemplo, elementos anteriores o posteriores de la ruta de BAFF-R.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayor parte de los factores de transcripción, que consisten en dominios de unión a y de activación del ADN que pueden separarse. En resumen, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica para BAFF-R se fusiona a un gen que codifica para el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, procedente de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica para una proteína no identificada ("presa" o "muestra") se fusiona a un gen que codifica para el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y "presa" pueden interactuar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de BAFF-R, los dominios de unión a y de activación del ADN del factor de transcripción se llevan a

- 20 proximidad cercana. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ) que está unido operativamente a un sitio de regulación de la transcripción que responde al factor de transcripción. Puede detectarse la expresión del gen indicador y pueden aislarse colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional y usarse para obtener el gen clonado que codifica para la proteína que interactúa con BAFF-R.
- 25 También se han descrito en el presente documento agentes novedosos identificados mediante los ensayos de selección descritos anteriormente y los usos de los mismos para los tratamientos tal como se describe en el presente documento.

### Ensayos de detección

Pueden usarse las partes o fragmentos de las secuencias del ADNc identificadas en el presente documento (y las secuencias génicas completas correspondientes) en numerosas formas como reactivos polinucleotídicos. Por

- 35 ejemplo, estas secuencias pueden usarse para: (i) mapear sus genes respectivos en un cromosoma; y, por tanto, ubicar regiones génicas asociadas con la enfermedad genética; (ii) identificar una forma individual de una muestra biológica diminuta (tipificación tisular); y (iii) ayudar en la identificación en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las subsecciones siguientes.

### Mapeo cromosómico

Una vez que se ha aislado la secuencia (o una parte de la secuencia) de un gen, esta secuencia puede usarse para mapear la ubicación del gen en un cromosoma. Este procedimiento se denomina mapeo cromosómico. En consecuencia, las partes o fragmentos de las secuencias de BAFF-R, descritos en el presente documento, pueden usarse para mapear la ubicación de los genes de BAFF-R, respectivamente, en un cromosoma. El mapeo de las secuencias de BAFF-R en los cromosomas es una primera etapa importante en la correlación de estas secuencias

- 40 con los genes asociados con enfermedad.

En resumen, los genes de BAFF-R pueden mapearse en los cromosomas mediante la preparación de cebadores de PCR (preferiblemente de 15-25 pb de longitud) a partir de las secuencias de BAFF-R. Puede usarse análisis por ordenador de las secuencias de BAFF-R para seleccionar rápidamente cebadores que no abarcan más de un exón en el ADN genómico, complicando así el proceso de amplificación. Estos cebadores pueden usarse entonces para la

- 50 detección mediante PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas individuales de una especie dada. Sólo aquellos híbridos que contienen el gen específico de especie correspondiente a las secuencias de BAFF-R darán un fragmento amplificado.

El mapeo mediante PCR de los híbridos de la células somáticas es un procedimiento rápido para la asignación de una secuencia particular a un cromosoma particular. Pueden asignarse tres o más secuencias por día usando un

- 55 único ciclador térmico. Usando las secuencias de BAFF para diseñar los cebadores olinucleotídicos, puede lograrse la sublocalización con paneles de fragmentos a partir de cromosomas específicos.

Puede usarse además la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) de una secuencia de ADN a una extensión cromosómica en metafase para proporcionar una ubicación cromosómica precisa en una etapa. Las extensiones cromosómicas pueden prepararse usando células cuya división se ha bloqueado en metafase mediante un compuesto químico como colcemid que afecta al uso mitótico. Los cromosomas pueden tratarse brevemente con tripsina y después teñirse con Giemsa. Se desarrolla un patrón de bandas claras y oscuras en cada cromosoma, de modo que los cromosomas pueden identificarse individualmente. La técnica de FISH puede usarse con una secuencia de ADN de tan solo 500 ó 600 bases. Sin embargo, los clones superiores a 1.000 bases tienen una mayor posibilidad de unirse a una única ubicación cromosómica con suficiente intensidad de señal para la detección simple. Preferiblemente 1.000 bases, y más preferiblemente 2.000 bases, bastarán para conseguir buenos resultados en una cantidad razonable de tiempo. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.* HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, N.Y., 1988.

Los reactivos para el mapeo cromosómico pueden usarse individualmente para marcar un único cromosoma o un único sitio en ese cromosoma, o pueden usarse paneles de reactivos para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas. En realidad, se prefieren los reactivos correspondientes a regiones no codificantes de los genes para fines de mapeo. Es más probable que las secuencias codificantes estén conservadas dentro de familias de genes, aumentando así la posibilidad de hibridaciones cruzadas durante el mapeo cromosómico.

Una vez que se ha mapeado una secuencia en una ubicación cromosómica precisa, puede correlacionarse la posición física de la secuencia en el cromosoma con los datos del mapeo genético. Tales datos se encuentran, por ejemplo, en McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, disponible on-line a través de la Welch Medical Library (Biblioteca Médica Welch) de la Universidad Johns Hopkins). Entonces puede identificarse la relación entre los genes y la enfermedad, mapeados en la misma región cromosómica, a través del análisis de unión (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes) descrito en, por ejemplo, Egeland *et al.* (1987) Nature, 325: 783-787.

Además, pueden determinarse diferencias en las secuencias de ADN entre los individuos afectados y los no afectados con una enfermedad asociada con el gen de BAFF-R. Si se observa una mutación en alguno o en todos los individuos afectados, pero no en ninguno de los individuos no afectados, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad particular. La comparación de los individuos afectados y no afectados supone generalmente una primera búsqueda de alteraciones estructurales en los cromosomas, tales como deleciones o translocaciones que son visibles a partir de las extensiones cromosómicas o que son detectables usando PCR basada en esa secuencia de ADN. Finalmente, puede llevarse a cabo la secuenciación completa de los genes de varios individuos para confirmar la presencia de una mutación y para distinguir las mutaciones de los polimorfismos.

#### Tipificación tisular

Las secuencias de BAFF-R descritas en el presente documento también pueden usarse para identificar individuos a partir de muestras biológicas diminutas. En esta técnica, el ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción y se sonda en una inmunotransferencia de tipo Southern para dar bandas únicas para su identificación. Las secuencias descritas en el presente documento son útiles como marcadores de ADN adicionales para RFLP ("polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción," descrito en la patente estadounidense número 5.272.057).

Además, las secuencias descritas en el presente documento pueden usarse para proporcionar una técnica alternativa que determina la secuencia de ADN real base por base de las partes seleccionadas del genoma de un individuo. Por tanto, las secuencias de BAFF-R descritas en el presente documento pueden usarse para preparar dos cebadores de PCR a partir de los extremos 5' y 3' de las secuencias. Estos cebadores pueden usarse entonces para amplificar el ADN de un individuo y para secuenciarlo posteriormente.

Los paneles de las secuencias de ADN correspondientes procedentes de los individuos, preparados de esta manera, pueden proporcionar identificaciones de individuos únicas, ya que cada individuo tendrá un único conjunto de tales secuencias de ADN debido a las diferencias alélicas. Las secuencias descritas en el presente documento pueden usarse para obtener tales secuencias de identificación a partir de los individuos y del tejido. Las secuencias de BAFF-R de la invención representan únicamente porciones del genoma humano. Se producen variaciones alélicas en cierto grado en las regiones codificantes de estas secuencias, y en un mayor grado en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre seres humanos individuales se produce con una frecuencia de aproximadamente una vez por cada 500 bases. Mucha de la variación alélica se debe a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que incluyen polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Cada una de las secuencias descritas en el presente documento puede usarse, hasta cierto punto, como un patrón frente al que puede compararse el ADN de un individuo para fines de identificación. Dado que se producen mayores números de polimorfismos en las regiones no codificantes, son necesarias menos secuencias para diferenciar a los individuos. Las secuencias no codificantes de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2B (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) pueden proporcionar cómodamente una identificación individual positiva con un panel de quizá 10 a 1.000 cebadores que proporcionan cada uno una secuencia amplificada no codificante de 100 bases. Si se usan secuencias codificantes previstas, tales como las de

la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2B (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6), un número más apropiado de cebadores para la identificación individual positiva sería de 500-2.000.

### Medicina predictiva

5 La medicina predictiva incluye ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica y ensayos clínicos de monitorización usados para fines de pronóstico (predictivos) para tratar así a un individuo profilácticamente. En consecuencia, se describen en el presente documento ensayos de diagnóstico para determinar la proteína BAFF-R y/o la expresión del ácido nucleico, así como la actividad de BAFF-R, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejido) para determinar así si un individuo está aquejado de una enfermedad o trastorno, o en riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R. También se han descrito en el presente documento ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico o la actividad. Por ejemplo, pueden someterse a ensayo mutaciones en un gen de BAFF-R en una muestra biológica. Tales ensayos pueden usarse para fines pronósticos o predictivos para tratar así profilácticamente a un individuo antes del comienzo de un trastorno caracterizado o asociado con la proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico o la actividad.

También se han descrito en el presente documento procedimientos para determinar la proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico o la actividad de BAFF-R en un individuo para seleccionar así los agentes terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (denominados en el presente documento "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de agentes (por ejemplo, fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo basándose en el genotipo del individuo (por ejemplo, el genotipo del individuo examinado para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente particular.)

Otro aspecto más descrito en el presente documento está relacionado con la monitorización de la influencia de los agentes (por ejemplo, fármacos, compuestos) en la expresión o la actividad de BAFF-R en los ensayos clínicos.

25 Estos y otros agentes se describen en mayor detalle en las secciones siguientes.

### Ensayos de diagnóstico

Un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de BAFF-R en una muestra biológica supone obtener una muestra biológica a partir de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente que puede detectar la proteína o el ácido nucleico de BAFF-R (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica para la proteína BAFF-R, de manera que se detecta la presencia de BAFF-R en la muestra biológica. Un agente para detectar el ARNm de BAFF-R o el ADN genómico es una sonda de ácido nucleico marcada que puede hibridarse con el ARNm de BAFF-R o el ADN genómico. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de longitud completa de BAFF-R, tal como los ácidos nucleicos de cualquiera de la figura 1A (SEQ ID N.º: 1), la figura 1B (SEQ ID N.º: 2), la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), la figura 2B (SEQ ID N.º: 4), la figura 3 (SEQ ID N.º: 6) o una parte de los mismos, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas al ARNm de BAFF-R o al ADN genómico. En el presente documento se describen otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención.

Un agente para detectar la proteína BAFF-R es un anticuerpo que puede unirse a la proteína BAFF-R, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "marcado", con respecto a la sonda o al anticuerpo, pretende englobar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante la reactividad con otro reactivo que esté marcado directamente. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado mediante fluorescencia y el marcaje en un extremo de una sonda de ADN con biotina, de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada mediante fluorescencia. El término "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presente dentro de un sujeto. Es decir, el procedimiento de detección puede usarse para detectar ARNm de BAFF-R, proteína, o ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de BAFF-R incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de la proteína BAFF-R incluyen ensayos de inmunoabsorción unidos a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección del ADN genómico de BAFF-R incluyen hibridaciones de tipo Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de la proteína BAFF-R incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado anti-BAFF-R. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas convencionales de obtención de imágenes.

La muestra biológica puede contener moléculas de proteína del sujeto de prueba. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de prueba o moléculas de ADN genómico del sujeto de prueba. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada mediante medios convencionales a partir de un sujeto.

- 5 Los procedimientos pueden suponer, además, obtener una muestra biológica control de un sujeto control, poner en contacto la muestra control con un compuesto o agente que pueda detectar la proteína BAFF-R, el ARNm, o el ADN genómico, de manera que se detecte la presencia de proteína BAFF-R, el ARNm o el ADN genómico en la muestra biológica, y comparar la presencia de la proteína BAFF-R, el ARNm o el ADN genómico en la muestra control con la presencia de la proteína BAFF-R, el ARNm o el ADN genómico en la muestra de prueba.
- 10 Se describen en el presente documento kits para detectar la presencia de BAFF-R en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender: un compuesto o un agente marcados que pueden detectar la proteína BAFF-R o el ARNm en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de BAFF-R en la muestra; y medios para comparar la cantidad de BAFF-R en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para el uso del kit para detectar la proteína
- 15 BAFF-R o el ácido nucleico.

### Ensayos de pronóstico

- Los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden utilizarse además para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R. Por ejemplo, los ensayos descritos en el presente documento, tales como los
- 20 ensayos de diagnóstico anteriores o los ensayos siguientes, pueden utilizarse para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con las proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico o la actividad en, por ejemplo, estados autoinmunitarios tales como la anemia hemolítica autoinmunitaria y el lupus eritematoso sistémico. Alternativamente, los ensayos de pronóstico pueden utilizarse para identificar a un sujeto que tiene o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno. Por tanto, se describe en el presente documento
- 25 un procedimiento para identificar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o la actividad aberrante de BAFF-R en el que se obtiene una muestra de prueba de un sujeto y se detecta la proteína o el ácido nucleico de BAFF-R (por ejemplo, ARNm, ADN genómico), en el que la presencia de la proteína o el ácido nucleico de BAFF-Res diagnóstico para un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R. Tal como se usa en el presente documento, una "muestra de prueba" se
- 30 refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un fluido (por ejemplo, suero), muestra celular, o tejido.

- Además, los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido,
- 35 ácido nucleico, molécula pequeña, u otro candidato farmacológico) para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R. Por ejemplo, tales procedimientos pueden usarse para determinar si puede tratarse a un sujeto eficazmente con un agente para un trastorno. Por tanto, se describen en el presente documento procedimientos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente por un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R en el que se obtiene una muestra de prueba y se detecta la proteína o el ácido nucleico de BAFF-R (por ejemplo, en el que la presencia de la proteína o el ácido
- 40 nucleico de BAFF-Res diagnóstico para un sujeto al que puede administrarse el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de BAFF-R.)

- Los procedimientos descritos en el presente documento también puede usarse para detectar lesiones genéticas en un gen de BAFF-R, determinando así si un sujeto con el gen lesionado está en riesgo de, o padece, un trastorno
- 45 tumorigénico o autoinmunitario. Los procedimientos pueden incluir detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada por al menos una de una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica para una proteína BAFF-R, o la expresión errónea del gen de BAFF-R. Por ejemplo, tales lesiones genéticas pueden detectarse mediante la determinación de la existencia de al menos una de
- 50 (1) una delección de uno o más nucleótidos de un gen de BAFF-R; (2) una adición de uno o más nucleótidos a un gen de BAFF-R; (3) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen de BAFF-R, (4) una transposición cromosómica de un gen de BAFF-R; (5) una alteración en el nivel de un transcrito de ARN mensajero de un gen de BAFF-R, (6) modificación aberrante de un gen de BAFF-R, tal como del patrón de metilación del ADN genómico, (7) la presencia de un patrón de corte y empalme de tipo no natural de un transcrito de ARN mensajero de un gen de BAFF-R, (8) un nivel de tipo no natural de una BAFF-R-proteína, (9) pérdida alélica de un gen de BAFF-R, y (10) modificación tras la traducción inapropiada de una BAFF-R-proteína. Tal como se describe en el presente documento, hay un gran
- 55 número de técnicas de ensayo conocidas en la técnica que pueden usarse para detectar lesiones en un gen de BAFF. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada mediante medios convencionales de un sujeto. Sin embargo, puede usarse cualquier muestra biológica que contenga células nucleadas, incluyendo, por ejemplo, células de la mucosa bucal.

- La detección de la lesión puede suponer el uso de una sonda / cebador en una reacción en cadena de la polimerasa
- 60 (PCR) (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.683.195 y 4.683.202), tales como PCR de

anclaje o RACE PCR, o, alternativamente, en la reacción en cadena del ligamiento (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran *et al.* (1988) *Science* 241: 1077-1080; y Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 360-364), siendo esta última particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen de BAFF-R (véase Abravaya *et al.* (1995) *Nucl. Ácidos Res.* 23: 675-682). Este procedimiento puede incluir la etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, ADN genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibridan específicamente con un gen de BAFF-R en condiciones tales que se produce la hibridación y la amplificación del gen de BAFF-R (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra control. Se prevé que la PCR y/o LCR pueden ser deseables para usar como una etapa de amplificación preliminar, junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones descritas en el presente documento.

Los procedimientos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencia automantenida (Guatelli *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh, *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177), Replicasa Q-Beta (Lizardi *et al.* (1988) *BioTechnology* 6: 1197), o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de las moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos.

Las mutaciones en un gen de BAFF-R de una célula de muestra pueden identificarse mediante alteraciones en los patrones de escisión de las enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de muestra y control, se amplifica (opcionalmente) se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de los fragmentos mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de longitud de los fragmentos entre el ADN de muestra y control indican mutaciones en el ADN de muestra. Además, el uso de ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.493.531) puede usarse para destacar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión de ribozimas.

Las mutaciones genéticas en BAFF-R pueden identificarse mediante la hibridación de ácidos nucleicos de muestra y control, por ejemplo, ADN o ARN, con matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas oligonucleotídicas (Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Med.* 2: 753-759). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en BAFF-R pueden identificarse en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas por luz, tal como se describe en Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255. En resumen, puede usarse una primera matriz de hibridación de sondas para explorar a través de grandes tramos de ADN en una muestra y en el control para identificar los cambios de bases entre las secuencias mediante la preparación de matrices lineales de secuencias de solapamiento secuenciales. Esta etapa permite la identificación de las mutaciones puntuales. Esta etapa va seguida por una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas mediante el uso de matrices de sondas más pequeñas y especializadas complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutación está compuesta por conjuntos de sondas paralelas, una complementaria al gen de tipo natural y la otra complementaria al gen mutante.

Puede usarse cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen de BAFF-R y detectar mutaciones mediante la comparación de la secuencia de BAFF-R de muestra con la secuencia de tipo natural (control) correspondiente. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en las técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560 o Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463. También se contempla que puede utilizarse cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se llevan a cabo los ensayos de diagnóstico (Naeve *et al.* (1995) *Biotechniques* 19: 448), incluyendo la secuenciación mediante espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación PCT internacional número WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36: 127-162; y Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 147-159).

Otros procedimientos para detectar mutaciones en el gen de BAFF-R incluyen procedimientos en los que se utiliza la protección de los agentes de escisión para detectar bases con apareamientos erróneos en los heterodúplex de ARN/ARN o de ARN/ADN (Myers *et al.* (1985) *Science* 230: 1242). En general, la técnica de "escisión de apareamientos erróneos" de la técnica comienza proporcionando heterodúplex de ARN o ADN formados mediante hibridación (marcados) que contienen la secuencia de BAFF-R de tipo natural con ARN o ADN potencialmente mutante obtenidos de una muestra de tejido. Los dúplex de cadena doble se tratan con un agente que escinde regiones de cadena sencilla de los dúplex tales como las que existirán debido a los apareamientos erróneos de pares de bases entre las hebras control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN pueden tratarse con ARNasa y los híbridos de ADN/ADN pueden tratarse con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones con apareamientos erróneos. En otras realizaciones, cualquiera de los dúplex de ADN/ADN o de ARN/ADN puede tratarse con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir las regiones con apareamientos erróneos. Tras la digestión de las regiones con apareamientos erróneos, el material resultante se separa entonces por tamaño sobre geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el sitio de mutación. Véase, por

ejemplo, Cotton *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba *et al.* (1992) Methods Enzymol. 217: 286-295. En una realización, el ADN o el ARN control pueden marcarse para su detección.

La reacción de escisión de apareamientos erróneos puede emplear una o más proteínas que reconocen los pares de bases con apareamientos erróneos en el ADN de doble cadena (denominadas enzimas de "reparación de apareamientos erróneos del ADN") en sistemas definidos para la detección y el mapeo de las mutaciones puntuales en ADNc de BAFF-R obtenidos de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en los apareamientos erróneos de G/A y la timidina ADN glicosilasa de las células HeLa escinde T en los apareamientos erróneos de G/T (Hsu *et al.* (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662). Una sonda basada en una secuencia de BAFF-R, por ejemplo, una secuencia de BAFF-R de tipo natural, se puede hibridar a un ADNc o a otro producto de ADN de una(s) célula(s) de prueba. El dúplex se trata con una enzima de reparación de apareamientos erróneos del ADN, y los productos de escisión, si los hay, pueden detectarse mediante protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.459.039.

Se pueden usar las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en los genes de BAFF-R. Por ejemplo, el polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) puede usarse para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre los ácidos nucleicos mutantes y los de tipo natural (Orita *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766, véase también Cotton (1993) Mutat. Res. 285: 125-144; Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79). Los fragmentos de ADN de cadena sencilla de los ácidos nucleicos de BAFF-R de muestra y control se desnaturalizarán y se permitirá que se renaturalicen. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos de cadena sencilla varía según la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede potenciarse mediante el uso de ARN (en lugar de ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización, el procedimiento objeto utiliza análisis de heterodúplex para separar las moléculas de heterodúplex de doble cadena partiendo de la base de los cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* (1991) Trends Genet. 7: 5).

Se puede someter a ensayo el movimiento de los fragmentos mutantes o de tipo natural en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente desnaturalizante usando electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) (Myers *et al.* (1985) Nature 313: 495). Cuando se utiliza DGGE como el procedimiento de análisis, el ADN se modificará para garantizar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo añadiendo una abrazadera de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC con alto punto de fusión mediante PCR. Se puede utilizar un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar las diferencias en la movilidad del ADN de muestra y control (Rosenbaum y Reissner (1987) Biophys. Chem. 265: 12753).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero sin limitarse a, hibridación de oligonucleótidos selectiva, amplificación selectiva o extensión de cebador selectiva. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores oligonucleotídicos en los que la mutación conocida se sitúa centralmente y después se hibrida con ADN diana en condiciones que permiten la hibridación sólo si se encuentra un apareamiento perfecto (Saiki *et al.* (1986) Nature 324: 163); Saiki *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230). Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN diana amplificado mediante PCR o con varias mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación y se hibridan con el ADN diana marcado.

Alternativamente, la tecnología de amplificación específica de alelo y que depende de la amplificación mediante PCR selectiva puede usarse junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) Nucl. Ácidos Res. 17: 2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador en el que, en las condiciones apropiadas, el apareamiento erróneo puede evitar, o reducir, la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) Tibtech 11: 238). Además, puede ser deseable introducir un sitio de restricción novedoso en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión (Gasparini *et al.* (1992) Mol. Cell. Probes 6: 1). Se prevé que en ciertas realizaciones también pueda llevarse a cabo amplificación usando la Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189). En tales casos, se producirá ligamiento sólo si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', posibilitando detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico mediante la búsqueda de la presencia o la ausencia de amplificación.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico previamente envasados que comprenden al menos un ácido nucleico de sonda o un reactivo de anticuerpo descrito en el presente documento, que puede usarse convenientemente por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que muestran síntomas o historia familiar de una enfermedad o dolencia que implica a un gen de BAFF-R.

Además, puede utilizarse cualquier tipo celular o tejido, en el que se expresa BAFF-R, en los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento. Sin embargo, puede usarse cualquier muestra biológica que contenga células nucleadas, incluyendo, por ejemplo, las células de la mucosa bucal.

## Farmacogenómica

Los agentes, o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de BAFF-R (por ejemplo, expresión del gen de BAFF-R), tal como se identificaron mediante un ensayo de selección descrito en el presente documento, pueden administrarse a individuos para tratar (de manera profiláctica o terapéutica) trastornos (por ejemplo, trastornos autoinmunitarios o relacionados con cáncer). Conjuntamente con tal tratamiento puede considerarse la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre un genotipo de un individuo y esa respuesta del individuo frente a un compuesto o fármaco extraño) del individuo. Las diferencias en el metabolismo de agentes terapéuticos pueden conducir a una toxicidad grave o fallo terapéutico alterando la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por tanto, la farmacogenómica del individuo permite la selección de agentes eficaces (por ejemplo, fármacos) para tratamientos terapéuticos o profilácticos basados en una consideración del genotipo del individuo. Tal farmacogenómica puede usarse además para determinar las dosificaciones apropiadas y regímenes terapéuticos. En consecuencia, la actividad de la proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico de BAFF-R, o el contenido de mutación de los genes de BAFF-R en un individuo puede determinarse para seleccionar así el(los) agente(s) apropiado(s) para el tratamiento profiláctico y terapéutico del individuo.

La farmacogenómica se ocupa de las variaciones hereditarias clínicamente significativas en respuesta a fármacos debidas a la disposición alterada del fármaco y la acción anómala en las personas afectadas. Véase por ejemplo, Eichelbaum (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23: 983-985 y Linder (1997) Clin. Chem. 43: 254-266. En general, pueden diferenciarse dos tipos de estados farmacogenéticos. Estados genéticos transmitidos como un factor único que alteran la forma en la que los fármacos actúan sobre el organismo (acción alterada del fármaco) o estados genéticos transmitidos como factores únicos que alteran la forma en la que el cuerpo actúa sobre los fármacos (metabolismo alterado del fármaco). Estos estados farmacogenéticos pueden producirse o bien como defectos raros o bien como polimorfismos. Por ejemplo, la insuficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía hereditaria común en la que la principal complicación clínica es la hemólisis tras la ingesta de fármacos oxidantes (antimalariales, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de judías.

Como realización ilustrativa, la actividad de las enzimas que metabolizan fármacos es un factor determinante principal tanto de la intensidad como de la duración de la acción farmacológica. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan fármacos (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y enzimas CYP2D6 y CYP2C19 del citocromo P450) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos farmacológicos esperados o muestran una respuesta farmacológica exagerada y toxicidad grave tras tomar la dosis convencional y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador rápido (EM) y el metabolizador lento (PM). La prevalencia del PM es diferente entre las diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica para CYP2D6 es sumamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en el PM, que conducen todas ellas a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores lentos de CYP2D6 y CYP2C19 experimentan bastante frecuentemente respuesta farmacológica y efectos secundarios exagerados cuando reciben las dosis convencionales. Si un metabolito es el resto terapéutico activo, el PM no muestra respuesta terapéutica, tal como se demuestra por el efecto analgésico de la codeína mediada por su metabolito formado por CYP2D6, la morfina. El otro extremo son los denominados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a las dosis convencionales. Recientemente, se ha identificado que la base molecular del metabolismo ultrarrápido se debe a la amplificación génica de CYP2D6.

Por tanto, la actividad de la proteína BAFF-R, la expresión del ácido nucleico de BAFF-R, o el contenido en mutaciones de los genes de BAFF-R en un individuo pueden determinarse para seleccionar así agente(s) apropiado(s) para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Además, los estudios farmacogenéticos pueden usarse para aplicar genotipificación de alelos polimórficos que codifican para enzimas que metabolizan fármacos para la identificación del fenotipo del grado de respuesta a los fármacos de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o a la selección de fármacos, puede evitar las reacciones adversas o el fracaso terapéutico y, por tanto, mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un modulador de BAFF-R, tal como un modulador identificado mediante uno de los ensayos de selección descritos en el presente documento.

## Monitorización de la eficacia clínica

Puede aplicarse la monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos, compuestos) sobre la expresión o actividad de BAFF-R (por ejemplo, la capacidad de modular la proliferación y/o diferenciación celular aberrante) no sólo en la selección de fármacos básica, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, puede monitorizarse la eficacia de un agente que se determina mediante un ensayo de selección tal como se describe en el presente documento para aumentar la expresión del gen de BAFF-R, los niveles de proteína, o regular por incremento la actividad de BAFF-R, en ensayos clínicos de sujetos que muestran una disminución en la expresión del gen de BAFF-R, los niveles de proteína, o actividad de BAFF-R regulada por disminución. Alternativamente, puede monitorizarse la eficacia de un agente que se determina mediante un ensayo de selección para disminuir la expresión del gen de BAFF-R, los niveles de proteína, o regular por disminución la actividad de BAFF-R, en ensayos clínicos de sujetos que muestran un aumento de la expresión del gen de BAFF-R, los niveles de proteína, o actividad de BAFF-R regulada por incremento. En tales ensayos clínicos, la expresión o actividad de BAFF-R y,

preferiblemente, otros genes que han estado implicados en, por ejemplo, un trastorno, pueden usarse como una "lectura" o marcadores del grado de respuesta inmunitaria de una célula particular.

Por ejemplo, pueden identificarse genes, incluyendo BAFF-R, que se modulan en células mediante tratamiento con un agente (por ejemplo, compuesto, fármaco o molécula pequeña) que modula la actividad de BAFF-R (por ejemplo, identificado en un ensayo de selección tal como se describe en el presente documento). Por tanto, para estudiar el efecto de los agentes sobre trastornos de proliferación celular, por ejemplo, en un ensayo clínico, las células pueden aislarse y puede prepararse el ARN y analizarse para determinar los niveles de expresión de BAFF-R y otros genes implicados en el trastorno. Pueden identificarse los niveles de expresión génica (es decir, un patrón de expresión génica) mediante análisis por transferencia de tipo Northern o RT-PCR, tal como se describe en el presente documento, o alternativamente midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los procedimientos descritos en el presente documento, o midiendo los niveles de actividad de BAFF-R u otros genes. De esta manera, el patrón de expresión génica puede servir como un marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células al agente. En consecuencia, este estado de respuesta puede determinarse antes, y en diversos puntos durante el tratamiento del individuo con el agente. Se describe en el presente documento un procedimiento para monitorizar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, proteína, péptido, peptidomimético, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato identificado mediante los ensayos de selección descritos en el presente documento) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra previa a la administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de una proteína BAFF-R, ARNm, o ADN genómico en la muestra previa a la administración; (iii) obtener una o más muestras posteriores a la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad de la proteína BAFF-R, ARNm, o ADN genómico en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína BAFF-R, ARNm o ADN genómico en la muestra previa a la administración con la proteína BAFF-R, ARNm o ADN genómico en la muestra o muestras posteriores a la administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. Por ejemplo, puede ser deseable un aumento de administración del agente para aumentar la expresión o actividad de BAFF-R hasta niveles superiores a los detectados, es decir, para aumentar la eficacia del agente. Alternativamente, puede ser deseable una disminución de la administración del agente para disminuir la expresión o actividad de BAFF-R hasta niveles inferiores a los detectados, es decir, para disminuir la eficacia del agente.

#### Procedimientos de tratamiento

La presente invención proporciona un polipéptido BAFF, o un anticuerpo anti-BAFF para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF-R y/o BAFF-R.

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un aumento (en relación a un sujeto que no padece la enfermedad o trastorno) de los niveles o actividad biológica, pueden tratarse con agentes terapéuticos que antagonizan (es decir, reducen o inhiben) la actividad. Pueden administrarse agentes terapéuticos que antagonizan con la actividad de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, (i) un polipéptido BAFF-R, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos; (ii) anticuerpos frente a un péptido BAFF-R; (iii) ácidos nucleicos que codifican para un péptido BAFF-R; (iv) se utiliza la administración de ácido nucleico antisentido y ácidos nucleicos que son "disfuncionales" (es decir, debido a una inserción heteróloga dentro de las secuencias codificantes de secuencias codificantes para un péptido BAFF-R) para "desactivar" la función endógena de un péptido BAFF-R mediante recombinación homóloga (véase, por ejemplo, Capecchi (1989) Science 244: 1288-1292); o (v) moduladores (es decir, inhibidores, agonistas y antagonistas, incluyendo peptidomiméticos adicionales de la invención o anticuerpos específicos frente a un péptido de la invención) que alteran la interacción entre un péptido BAFF-R y su pareja de unión.

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un descenso (en relación con un sujeto que no padece la enfermedad o trastorno) en los niveles o actividad biológica pueden tratarse con agentes terapéuticos que aumentan (es decir, son agonistas para) la actividad. Los agentes terapéuticos que regulan por incremento la actividad pueden administrarse de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, un péptido BAFF-R, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos; o un agonista que aumente la biodisponibilidad.

El aumento o disminución de los niveles puede detectarse fácilmente cuantificando los péptidos y/o ARN, obteniendo una muestra de tejido del paciente (por ejemplo, tejido de biopsia) y someténdola a ensayo *in vitro* para determinar los niveles de péptido o ARN, la estructura y/o actividad de los péptidos expresados (o ARNm de un péptido BAFF-R). Los procedimientos que se conocen bien en la técnica incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos (por ejemplo, mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación seguida por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS), inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de ARNm (por ejemplo, ensayos de tipo Northern, inmunotransferencias puntuales, hibridación *in situ*, etc.).

También se describe en la presente solicitud un procedimiento para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o estado asociado con una expresión o actividad aberrante de BAFF-R, administrando a un sujeto un agente que modula la expresión de BAFF-R o al menos una actividad de BAFF-R. Pueden identificarse sujetos en riesgo de padecer una

enfermedad que está provocada o a la que contribuye la expresión o actividad aberrante de BAFF-R mediante, por ejemplo, cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico tal como se describe en el presente documento. Puede producirse la administración de un agente profiláctico antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración de BAFF-R, de modo que se previene una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa su progresión. Dependiendo del tipo de aberración de BAFF-R, por ejemplo, puede usarse un agonista de BAFF-R o un antagonista de BAFF-R para tratar al sujeto. Puede determinarse el agente apropiado basándose en ensayos de selección descritos en el presente documento.

También se describen en el presente documento procedimientos para modular la expresión o actividad de BAFF-R para fines terapéuticos. El procedimiento modulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de la actividad de la proteína BAFF-R asociadas con la célula. Un agente que modula la actividad de la proteína BAFF-R puede ser un agente tal como se describe en el presente documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando análogo que se produce de manera natural de una proteína BAFF-R, un péptido, un peptidomimético de BAFF-R, u otra molécula pequeña. El agente puede estimular una o más actividades de la proteína BAFF-R. Los ejemplos de tales agentes estimuladores incluyen la proteína BAFF-R activa y una molécula de ácido nucleico que codifica para BAFF-R que se ha introducido dentro de la célula. El agente puede inhibir una o más actividades de la proteína BAFF-R. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico de BAFF-R antisentido y anticuerpos anti-BAFF-R. Estos procedimientos moduladores pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tales, se describen en el presente documento procedimientos para tratar a un individuo aquejado de un trastorno o enfermedad caracterizada por la expresión o actividad aberrante de una molécula de proteína o ácido nucleico de BAFF-R. El procedimiento puede implicar administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado mediante un ensayo de selección descrito en el presente documento) o una combinación de agentes que modulan (por ejemplo, regulan por incremento o regulan por disminución) la expresión o actividad de BAFF-R. El procedimiento puede implicar administrar una molécula de proteína o ácido nucleico de BAFF-R como tratamiento para compensar la expresión o actividad aberrante o reducida de BAFF-R.

También se describen en el presente documento procedimientos para usar BAFF-R. Se incluyen en tales métodos, procedimientos para inhibir el crecimiento de células B, el crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas o la producción de inmunoglobulina en un animal usando polipéptido BAFF-R que comprende al menos una parte de unión a BAFF de BAFF-R. Los procedimientos pueden incluir estimular el crecimiento de células B, el crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas o la producción de inmunoglobulina en un animal usando polipéptido BAFF-R (tal como transfectando células que son deficientes en BAFF-R con vectores para permitir la expresión eficaz de BAFF-R, o administrando anticuerpos que se unen a BAFF-R e imitan a BAFF).

También se describen en el presente documento procedimientos para usar BAFF-R en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, hipertensión, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos de proliferación linfática de células B, trastornos inmunosupresores, trasplantes de órganos, y VIH. También se incluyen procedimientos para usar los agentes para tratar, suprimir o alterar una respuesta inmunitaria que implica una ruta de señalización entre BAFF-R y su ligando, y procedimientos para inhibir la inflamación administrando un anticuerpo específico para BAFF-R o un epítopo del mismo.

Los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo preferiblemente administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido BAFF-R, una molécula quimérica que comprende un polipéptido BAFF-R fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga, o un homólogo de anticuerpo anti-BAFF-R.

En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido BAFF-R y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden polipéptidos BAFF-R fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Un ejemplo de tal molécula quimérica comprende BAFF-R fusionado a una región Fc de una inmunoglobulina o una secuencia señal de epítopo.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido BAFF-R. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Se describe en el presente documento un procedimiento para tratar un mamífero de un estado asociado con proliferación celular no deseada administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un antagonista de BAFF-R, en el que el antagonista de BAFF-R comprende un polipéptido que antagoniza la interacción entre BAFF-R y su receptor o receptores análogos, con un destinatario farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, el receptor análogo de BAFF sobre la superficie de la célula es BAFF-R.

El procedimiento puede usarse con cualquier antagonista de BAFF-R que tenga un polipéptido que antagonice la interacción entre BAFF y su receptor o receptores análogos. Los ejemplos de antagonistas de BAFF incluyen pero no se limitan a polipéptido BAFF-R soluble, moléculas de BAFF-R quiméricas solubles, incluyendo pero sin limitarse a BAFF-R-IgG-Fc y homólogos de anticuerpos anti-BAFF-R.

- 5 Polipéptidos BAFF-R y anticuerpos anti-BAFF-R de la invención se pueden usar para tratar células tumorales que expresan BAFF y/o BAFF-R.

10 Pueden seleccionarse ejemplos de cánceres cuya proliferación celular se modula mediante BAFF midiendo *in vitro* el nivel de mensajero de BAFF y/o BAFF-R en bibliotecas de tejidos tumorales. Las bibliotecas de tejidos tumorales en las que se expresa altamente el mensajero de BAFF y/o BAFF-R serían candidatos. Alternativamente, puede seleccionarse para detectar candidatos buscando en las bases de datos públicas y privadas (es decir, base de datos de Incyte) con, por ejemplo, la secuencia de ADNc de BAFF humano de longitud completa.

15 Los antagonistas de BAFF-R que se usan para tratar estados asociados con proliferación celular no deseada, en particular tratamiento tumoral, inhiben ventajosamente el crecimiento de células tumorales en más del 10%, 20%, 30% o 40% y lo más ventajosamente en más del 50%. Los antagonistas de BAFF-R se obtienen mediante selección. Por ejemplo, pueden seleccionarse antagonistas de BAFF-R basándose en la actividad inhibidora del crecimiento (es decir, superior al 10%, 20%, 30%, 40% o 50%) frente al carcinoma HT29 de colon humano o el carcinoma A549 de pulmón humano que derivan de un tumor de colon y de pulmón respectivamente.

20 También se describen en el presente documento procedimientos para inhibir el crecimiento de células B y de células que no son B, el crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas o la producción de inmunoglobulina en un animal usando polipéptidos BAFF-R tales como los descritos anteriormente.

25 El procedimiento para inhibir el crecimiento de células B y células que no son B, el crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas o la producción de inmunoglobulinas también puede incluir la administración de anticuerpo anti-BAFF-R (policlonal monoclonal) que se une a BAFF-R e inhibe la unión de BAFF a BAFF-R. La administración del anticuerpo inhibe de ese modo el crecimiento de células B y células que no son B, el crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas o la producción de inmunoglobulinas. La cantidad de anticuerpo que puede ser adecuada para su uso puede extrapolarse a partir de los datos *in vivo* proporcionados en el presente documento. Se conocen diversos procedimientos en la técnica para extrapolar las dosificaciones a partir de experimentos con animales, incluyendo por ejemplo, la extrapolación basada en el peso corporal o el área superficial.

30 En algunas realizaciones de la invención se administran los polipéptidos BAFF-R:Fc o los anticuerpos anti-BAFF-R en una cantidad de aproximadamente 1 a 20 mg/kg/dosis. Las dosis pueden darse dos veces a la semana, una vez a la semana, una cada dos semanas o una vez al mes, tal como se necesite. Un médico podrá determinar la dosis apropiada determinando la eficacia equilibrada frente a la reducción de cualquier efecto perjudicial de la terapia.

35 También se describen en el presente documento procedimientos para usar BAFF-R o anticuerpos anti-BAFF-R en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, hipertensión, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos de proliferación linfática de células B, enfermedades inmunosupresoras, trasplantes de órganos, inflamación y VIH. También se incluyen procedimientos para usar agentes para tratar, suprimir o alterar una respuesta inmunitaria que implica una ruta de señalización entre BAFF-R y su ligando.

#### **Procedimientos para inhibir la agregación de proteína expresada, incluyendo BHAFF-R y BAFF-R:Fc**

40 La invención también proporciona un procedimiento para inhibir o disminuir la agregación de proteína expresada, particularmente BAFF-R humana o huBAFF-R:Fc, que tiende a agregarse durante la expresión, impidiendo la purificación a altos rendimientos. En el procedimiento de la invención, la secuencia de aminoácidos de una proteína que tiende a agregarse cuando se expresa en un sistema recombinante se compara con la secuencia de aminoácidos de un homólogo de la proteína que muestra menos actividad de agregación. Los dos homólogos tendrán dominios conservados y aminoácidos no conservados entre ellos y quizá intercalados en los mismos. En general, al menos uno de los aminoácidos no conservados de la proteína de agregación puede sustituirse por el aminoácido en el homólogo para paliar la agregación. En algunas realizaciones, se sustituyen los aminoácidos no polares. Los aminoácidos no polares incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína. En algunas realizaciones, los aminoácidos no polares se sustituyen por otros aminoácidos no polares. Los aminoácidos no polares preferidos para inhibir o disminuir la agregación son prolina y alanina. En otras realizaciones, se sustituye un aminoácido polar no cargado por un aminoácido no polar. Los aminoácidos polares no cargados incluyen asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.

55 En el procedimiento de la invención, se hacen sustituciones que permiten preferiblemente que la proteína conserve su actividad biológica. En general, los aminoácidos no conservados están dispuestos para la sustitución sin afectar apreciablemente a la actividad biológica.

En un ejemplo específico del procedimiento de la invención, la proteína BAFF-R humana puede tener sustituciones de aminoácidos introducidos en las posiciones V20, P21, A22 y L27 de SEQ ID N.º: 5 (o V41, P42, A43, y L48 de

SEQ ID N.º: 12) y diversas combinaciones de las mismas, que palían en gran medida la agregación de la proteína. Pueden usarse estrategias similares para otras proteínas que tienden a agregarse cuando se expresan en sistemas recombinantes. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría particular de operación, se cree que la sustitución de aminoácidos polares no cargados por aminoácidos no polares confiere solubilidad a la proteína y no fomenta la agregación de regiones no polares entre las proteínas.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Este ejemplo describe la clonación molecular de BAFF-R, un receptor novedoso para BAFF.

#### Materiales y procedimientos

- 10 Se construyó una biblioteca de ADNc cebada con oligo-dT a partir de células BJAB, una línea de células B humanas que se unen a BAFF humano, y se clonó direccionalmente en el vector de expresión CH269. CH269 es un derivado de pCEP4 (Invitrogen) que contiene el promotor de CMV para dirigir la expresión del ADN clonado y también contiene el oriP del VEB. Esto permite la replicación autónoma de múltiples copias de estos plásmidos en las células que están transformadas de manera estable con EBNA-1, tal como 293EBNA. Se transfeció la biblioteca de ADNc de BJAB en células DH10B de *E. coli* y se sembraron en un formato de 96 pocillos como conjuntos de aproximadamente 2500 clones independientes por pocillo. Se preparó el ADN a partir de estos conjuntos usando el Qiagen BioRobot 9600. Se transfecieron los conjuntos de ADN usando Lipofectamine (Life Technologies) dentro de células 293EBNA sembradas en placas de 6 pocillos recubiertas con fibronectina. A las 48 horas tras la transfección, se eliminó el medio y se lavaron las células con tampón de lavado del ensayo de placa (HEPES 20 mM, albúmina de suero bovino 0,5 mg/ml, NaN<sub>3</sub> al 0,1 %). Se recubrieron las monocapas celulares con myc-BAFF soluble recombinante humano biotinilado 100 mg/ml (myc-huBAFF) en tampón de unión (PBS, suero bovino fetal al 2%, NaN<sub>3</sub> al 0,1%) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se expresó el myc-huBAFF (aminoácidos 136-285) usado en el ensayo en *Pichia pastoris* y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico seguido por filtración en gel.
- 25 Se eliminó la solución de BAFF y se lavaron y fijaron las células mediante incubación con formaldehído al 1,8%-glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Se lavaron de nuevo las células y se incubaron entonces durante 30 minutos con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (SAV-AP) (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1: 3000 a partir de la reserva en tampón de unión. Se lavaron las células y se tiñeron con rojo rápido/naftol fosfato (Pierce). Se identificaron las células que se unían al complejo biotina-BAFF/SAV-AP por la presencia de un precipitado rojo tras la inspección bajo microscopía de baja potencia. La selección secundaria conlleva sembrar en placas las reservas en glicerol de DH10B de los conjuntos de unión a BAFF para obtener colonias únicas, inocular en cultivo en conjuntos de 100, y repetir el ensayo de unión a BAFF tal como se describió anteriormente. Los conjuntos positivos de selección secundaria se dividieron de manera similar en clones individuales y se sometieron a ensayo para determinar la unión a BAFF tras la transfección en 293EBNA tal como se describió anteriormente. Se determinó la secuencia de ADN de los clones de unión a BAFF independientes.

#### Resultados

- Uno de los clones de unión a BAFF era pJST576. Tiene un tamaño de inserto de 1201 pares de bases (pb) sin incluir la cola de poli-A. Se muestra la secuencia del inserto de pJST576 en la figura 1A (SEQ ID N.º: 1). El análisis BLAST de este clon mostró homología en la base de datos Genbank con el clon HS250D10 del cromosoma 22 BAC (número de registro Z99716). Se encuentra la secuencia completa de pJST576 dentro de este BAC. También se encontró homología con el extremo 3' de un EST humano, AI250289 (clon 2000271 IMAGE). Se generó el EST a partir de una biblioteca de linfoma folicular humano. Se obtuvo el EST AI250289 de Incyte y se determinó la secuencia del inserto (figura 1B) (SEQ ID N.º: 2). Esta secuencia añadía 15 pb de la secuencia 5' a la secuencia de pJST576, que es contigua con la secuencia genómica y 23 pb, que no lo eran. El resto de la secuencia EST tiene una homología perfecta con pJST576. No pudo identificarse un marco de lectura abierto en estos clones.

### Ejemplo 2

En este ejemplo, se determina que el ADNc de JST576 contiene un intrón y establece entonces un marco de lectura abierto.

#### Procedimientos

- 50 Se ejecutó el programa de predicción de exones GENSCAN (Burge, C. & Karlin, S. J. (1997) Mol. Biol. 268: 78-94) sobre la secuencia de ADNc de JST576. Los resultados de este programa predijeron que estaba presente un intrón en el ADNc. Con el fin de determinar si la predicción era correcta, se realizó análisis por PCR sobre el ADNc de la primera cadena de 2 líneas celulares que expresaban JST576. Se purificó el ARN de aproximadamente 10<sup>7</sup> células BJAB o IM-9 usando el kit RNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo sugerido por los fabricantes. Se cuantificó el ARN y se usaron 5 µg para las reacciones del ADNc de la primera cadena usando el kit de preamplificación Superscript (Life Technologies). Se usaron tanto oligo dT como hexámeros aleatorios para generar el producto de la primera

cadena. Se realizó la síntesis de la primera cadena siguiendo el protocolo recomendado. Se usaron entonces tres (1 de cada reacción, 10 ng de JST576 o sin ADN) como un molde para la PCR usando oligonucleótidos que flanqueaban el intrón predicho. Los oligonucleótidos usados en la reacción son los oligos 5' BAF-225

[5'- GGCCGAGTGCTTCGACCTGCT-3'] (SEQ ID N.º: 33) o BAF-226

5 [5'-GGTCCGCCACTGCGTGGCCTG-3'] (SEQ ID N.º: 34) y el oligo 3' BAF-191

[5'-CACCAAGACGGCCGGCCCTGA-3'] (SEQ ID N.º: 35). Cada reacción contenía tampón Pfu 1x (Stratagene), dNTP 200 M, DMSO al 10%, 150 ng de cada oligo, y 1,25 unidades de polimerasa Turbo Pfu (Stratagene). Se llevaron a cabo las reacciones durante 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 min, y 72°C durante 1,5 min. Se procesaron diez µl de cada reacción sobre un gel de agarosa al 1%. Se purificaron los productos restantes de las reacciones de BJAB e IM-9 BAF-225/191 usando el kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche Molecular Biochemicals) y se sometió el producto a granel a secuenciación del ADN. Además, se generaron productos de PCR usando los cebadores BAF-225 y BAF-191 a partir del ADNc de las células B restantes, se subclonaron y se secuenciaron clones individuales. Se usaron aquí 5 µl de ADNc de las células B restantes (Clontech) en una reacción de PCR con los cebadores BAF-225 y BAF-191 tal como se detalló anteriormente. Se purificó entonces el producto de PCR usando el kit de purificación de productos de PCR High Pure y se concentró. Con el fin de subclonar el fragmento de PCR, se fosforilaron los extremos del fragmento y se hicieron romos usando el kit de ligación Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech) tal como se recomendó. Se clonó el producto resultante en el sitio EcoRV de pBluescriptII (Stratagene) y se transformó en *E. coli*. Se hicieron crecer colonias individuales, se realizaron minipreparaciones del ADN. Se secuenciaron seis aislados independientes.

## Resultados

En la figura 2A se muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos madura predicha de JST576 (SEQ ID N.º: 3) mediante el programa GENSCAN. En la figura 2B se muestran los productos de PCR que abarcan el intrón predicho y confirman la existencia de un intrón en el clon de ADNc de JST576. El tamaño predicho del producto de PCR del ADNc de JST576 es aproximadamente 788 pb para BAF-225/BAF-191 y 767 pb para BAF-226BAF-191. Los productos de PCR obtenidos a partir del molde de JST576 son aproximadamente de este tamaño (carriles 10 y 11). Los productos de PCR obtenidos usando BAF-22SBAF-191 sobre o bien BJAB cebado con oligo dT o bien ADNc de la primera cadena de IM-9 (carriles 2 y 6) son del mismo tamaño y significativamente más cortos que el producto del ADNc de JST576. El tamaño predicho de este fragmento sin el intrón predicho es de 484 pb. El tamaño de los productos de PCR es consecuente con este tamaño. Se obtuvieron los mismos resultados si se cebaba ARN de BJAB o IM-9 con hexámeros aleatorios (carriles 4 y 8). Las reacciones que usaban BAF-226BAF-191 no funcionaron sobre los moldes de ADNc de la primera cadena. Por tanto, parece que el intrón predicho por el programa GENSCAN existe en el ADNc de JST576. Se confirmó la secuencia del producto cortado y empalmado del ARN de BJAB e IM-9 secuenciando el producto de PCR a granel y se refleja en la secuencia mostrada en la figura 2C (SEQ ID N.º: 4). La secuencia es idéntica a la secuencia mostrada en la figura 2A (SEQ ID N.º: 3), excepto por la ausencia del codón de alanina (GCA) en el nucleótido 149 (mostrado en letras pequeñas). Los resultados de la secuenciación de 6 clones independientes a partir de la reacción de RT-PCR sobre el ADNc de las células B restantes indican que se utilizan ambos sitios aceptores de corte y empalme. El sitio aceptor preferido parece ser el producto que da como resultado un residuo de alanina (5/6 de los clones). Sin embargo, la secuencia predicha por GENSCAN (SEQ ID N.º: 3), que contiene dos alaninas, se observó en 1/6 de los clones. Por tanto, se ha establecido un marco de lectura abierto para JST576 humano y se ha determinado una variante de corte y empalme de aminoácido único. El marco de lectura abierto predice una proteína de 184 aminoácidos mostrada en la figura 2D (SEQ ID N.º: 5). El residuo de alanina (A) representa la variante de corte y empalme. Esta proteína se denomina BAFF-R. La secuencia de aminoácidos deducida de BAFF-R incluye una región hidrófoba de los residuos 72-100 (algoritmo de Hopp-Woods) y un posible segmento transmembrana de los residuos 84-102 tal como se analizó mediante el algoritmo TMPred. A esta región le sigue un tramo altamente cargado de aminoácidos que puede funcionar como una señal de parada de la transferencia. BAFF-R carece de una secuencia señal N-terminal y es una proteína de membrana tipo III similar a las otras BAFF que se unen a las proteínas BCMA (Laabi *et al.* (1992) EMBO J. 11: 3897-3904) y TACI (von Bulow y Bram, (1997) Science 278: 138-141). Se predice que el extremo N-terminal es el dominio extracelular de BAFF-R y contiene un motivo de 4 cisteínas en los residuos 19-35 a diferencia de cualquier otro miembro de la familia de receptores de TNF. Se predice que el extremo C-terminal de BAFF-R es el dominio intracelular.

## Ejemplo 3

Se determinó en el presente documento la secuencia de ADN en el sentido de 5' de la metionina de inicio propuesta para BAFF-R humano que incluye un codón de parada en marco.

## 55 Procedimientos

Se preparó un cebador BAF-254 (5'GGGCGCCTACAATCTCAGCTA 3') (SEQ ID N.º: 36) para la secuencia genómica presente en el BAC HS250d10 (número de registro en Genbank Z99716), en el sentido de 5' del ATG propuesto y se usó en una reacción de PCR con el oligo BAF-236 (5' GGCGGACCAGCAGGTCGAAGCACTC 3')

(SEQ ID N.º: 37). El molde en la reacción era el ADNc de la primera cadena preparado a partir de ARN de bazo humano (Clontech) usando el kit de preamplificación de PCR tal como se describe por el fabricante (Life Technologies). La reacción de PCR contenía 3 µl de la reacción de la primera cadena, tampón Pfu 1 x (Stratagene), DMSO al 10%, dNTP 0,2 mM, 150 ng de cada cebador y 1,25 unidades de polimerasa Pfu Turbo (Stratagene). Se purificó el producto de PCR usando el kit de purificación de productos de PCR High Pure siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals). Los extremos del producto de PCR se hicieron romos y se fosforilaron usando el kit de ligación Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech), se clonó en el sitio EcoRV de BSK2 (Stratagene) y se transformó en células DH5. Se realizaron minipreparaciones de las colonias resultantes de la ligación usando el sistema Wizard (Promega) y se secuenciaron entonces usando una máquina ABI.

## 10 Resultados

La secuencia del producto de PCR confirma que el ARNm contiene secuencias directamente corriente arriba del ATG que está contenido en la secuencia genómica. Esta secuencia está subrayada en la secuencia mostrada en la figura 3. La presencia de un codón de parada en sentido 5' en marco y la ausencia de otra metionina indican que la metionina encontrada en el ADNc de JST576 es la metionina de inicio correcta.

## 15 Ejemplo 4

Este ejemplo describe la clonación del ADNc de BAFF-R murino.

### Procedimientos

Se seleccionaron aproximadamente un millón de placas de fago a partir de la biblioteca de ADNc de la línea celular A20 murina adquirida de Stratagene (La Jolla, CA) tal como se detalla por el fabricante. Se digirió el ADNc de BAFF-R humano de JST576 con EcoNI y se procesó sobre un gel de fusión baja al 1%. Se cortó del gel el fragmento de 425 pb que contenía y se pesó. Se añadió tres veces el volumen de agua y se hirvió el fragmento de gel durante 5 minutos. Se marcó el fragmento con 50 µCi <sup>32</sup>P-CTP (Amersham) en una reacción que contenía Tris 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, β-mercaptoetanol 10 µM, HEPES 200 mM pH 6,5, dNTP 20 M (excepto dCTP), 0,27 unidades de pd(N)6 hexanucleótidos (Amersham Pharmacia Biotech) y 1 unidad de enzima Klenow (USB) durante la noche a temperatura ambiente. Se incubaron aproximadamente un millón de recuentos por ml de sonda con los filtros en tampón de selección de placas (Tris 50 mM, SDS al 1%, NaCl 1M, pirofosfato de sodio al 0,1%, PVP al 0,2%, Ficoll al 0,2%, BSA al 0,2%) durante la noche a 65°C. Se lavaron los filtros en SSC 2 X y SDS al 1% a 50°C durante 1,5 horas (3 x 2 litros) y se expusieron entonces a película de rayos X durante 2 días. Se identificaron aproximadamente 36 placas positivas. De estas, se purificaron 6 placas. Se liberaron los fagémidos usando el protocolo de escisión *in vivo* detallado por Stratagene. Se hicieron crecer las colonias resultantes y se realizaron minipreparaciones del ADN (Qiagen). Se secuenciaron los clones de ADNc.

### Resultados

En la figura 4A se presenta la secuencia de nucleótidos consenso de BAFF-R murino (SEQ ID N.º: 8) y se presenta la secuencia de aminoácidos en la figura 4B (SEQ ID N.º: 9). Tres de los clones contenían una delección de 10 aminoácidos desde el aminoácido 119 hasta el 129 en el dominio intracelular de BAFF-R murino. El alineamiento de la secuencia del BAFF-R humano y murino ilustra que se conservan 4 residuos de cisteína en el dominio extracelular, que la posición de la metionina de inicio es similar y que la región C-terminal de las proteínas está altamente conservada (figura 4C), siendo idénticos los últimos 24 residuos. Las secuencias tienen aproximadamente el 56% de identidad global.

## 40 Ejemplo 5

En este ejemplo, se describe la capacidad de BAFF soluble recombinante humano para unirse a células cotransfectadas con pJST576 y un plásmido indicador GFP.

### Materiales y procedimientos

El plásmido indicador codifica para una molécula de GFP anclada a la membrana y permite la identificación de las células transfectadas de las células no transfectadas. Se cotransfectaron células 293EBNA con el plásmido indicador y pJST576 usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies). A las 18-20 horas tras la infección, se separaron las células de las placas con EDTA 5 mM en PBS y se contaron. Se lavaron las células dos veces con tampón FACS (PBS que contiene el 10% de suero bovino fetal, NaN<sub>3</sub> al 0,1%) y se incubaron 2,5 x 10<sup>5</sup> células durante 1 hora en hielo con myc-huBAFF biotinilado diluido en tampón FACS en un intervalo de concentración de 8 ng/ml a 5 µg/ml. Se lavaron las células con tampón FACS y se incubaron durante 30 minutos con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SAV-PE) (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:100 a partir de la reserva. Se lavaron de nuevo las células con tampón FACS y se resuspendieron en paraformaldehído al 1% en tampón FACS. Se analizaron las células por FACS para detectar la fluorescencia de GFP y PE y se dio formato a los datos en un gráfico de puntos de cuatro cuadrantes. Los puntos en los dos cuadrantes hacia la derecha representan células que expresan el GFP indicador de la transfección. Los puntos en los dos cuadrantes superiores representan células que

tienen myc-huBAFF biotinilado unido, revelándose esta unión mediante la SAV-PE. Las células en el cuadrante superior derecho son células transfectadas que se unen a myc-huBAFF biotinilado.

### Resultados

5 Las células no teñidas y las células teñidas sólo con SAV-PE muestran que aproximadamente el 50% con positivas para GFP y se han cotransfectado con el plásmido indicador (figura 5). Cuando las células cotransfectadas con el indicador GFP y pJST576 se tiñen con myc-huBAFF biotinilado 1 µg/ml casi todas las células del cuadrante inferior derecho se desplazan hacia arriba, indicando una unión a BAFF. Se observa un resultado similar si se cotransfecta un plásmido que expresa huTACI en lugar de pJST576. Se conoce que TACI se une a BAFF. Se tiñeron las células con diluciones de 5 veces de myc-huBAFF biotinilado desde 5 µg/ml hasta 8 ng/ml y a medida que la concentración de myc-huBAFF biotinilado desciende, la intensidad del desplazamiento desciende.

### Ejemplo 6

En este ejemplo, se describe la capacidad de BAFF soluble recombinante humano o BAFF soluble recombinante murino para unirse a células cotransfectadas con pJST576 y un plásmido indicador de GFP.

### Materiales y procedimientos

15 Las cotransfecciones en 293EBNA fueron tal como se describió en el ejemplo 5. A las 18-20 horas tras la transfección, se separaron las células, se contaron y se tiñeron para el análisis por FACS similar al ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. Se incubaron las células durante 1 hora en hielo con 5 µg/ml de BAFF-flag soluble recombinante o bien humano o bien murino, seguido tras el lavado por la incubación durante 30 minutos con 5 µg/ml del anticuerpo M2 monoclonal anti-flag (Sigma Aldrich), y se revelaron entonces incubando las células lavadas durante 30 minutos con IgG de mono anti-ratón conjugada con PE (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:100 a partir de la reserva. Se lavaron de nuevo las células, se fijaron con paraformaldehído, y se analizaron por FACS para determinar las células positivas para GFP y PE.

### Resultados

25 Aproximadamente el 50% de las células son positivas para GFP y por tanto se han cotransfectado con el plásmido indicador (figura 6). Cuando las células cotransfectadas con el indicador GFP y pJST576 se tiñeron con 5 µg/ml de flag-BAFF soluble recombinante o bien humano o bien murino, casi todas las células del cuadrante inferior derecho se desplazaron hacia arriba. Esto indica que tanto BAFF humano como murino se une a células transfectadas con pJST576.

### Ejemplo 7

30 En este ejemplo, se describe la incapacidad de APRIL soluble recombinante murino para unirse a células cotransfectadas con pJST576 y un plásmido indicador de GFP.

### Materiales y procedimientos

35 Las cotransfecciones en 293EBNA fueron tal como se describió en el ejemplo 5. A las 18-20 horas tras la transfección, se separaron las células, se contaron y se tiñeron para el análisis por FACS similar al ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. Se incubaron las células durante 1 hora en hielo con 1 µg/ml de myc-APRIL soluble recombinante murino, seguido tras el lavado por la incubación durante 30 minutos con 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-APRIL murino, seguido por una incubación de 30 minutos de las células lavadas con 5 µg/ml de IgG2b anti-rata biotinilado (Pharmingen), y se revelaron finalmente incubando las células lavadas durante 30 minutos con SAV-PE. Se lavaron de nuevo las células, se fijaron con paraformaldehído, y se analizaron por FACS para determinar las células positivas para GFP y PE.

### Resultados

45 Aproximadamente el 50% de las células son positivas para GFP y por tanto se han cotransfectado con el plásmido indicador (figura 7). Cuando las células cotransfectadas con el indicador GFP y pJST576 se tiñen con 1 µg/ml de myc-APRIL murino, ninguna de las células del cuadrante inferior derecho se desplaza hacia arriba. Esto es al contrario que las células cotransfectadas con un plásmido que expresa TACI humano en lugar de pJST576. En estas células transfectadas, casi todas fueron positivas para la unión a myc-APRIL murino. Se ha mostrado previamente que tanto BAFF como APRIL se unen tanto a TACI como a BCMA. Por tanto, el hecho de que APRIL no se una a BAFF-R cuando se expresa sobre células transfectadas con pJST576 indica una especificidad de BAFF-R por BAFF.

### Ejemplo 8

Este ejemplo describe la capacidad de BAFF-R cuando se expresa a partir de pJST576 de inmunoprecipitarse conjuntamente mediante flag-BAFF humano soluble recombinante.

## Materiales y procedimientos

Se transfectaron células 293EBNA mediante Lipofectamina 2000 con pJST576, un vector sólo de control, o un plásmido que expresa huTACI como un control positivo para la unión a BAFF. Tras 20 horas de incubación, se aspiró el medio de transfección, se lavaron las células con PBS, y se substituyó el medio por medio de marcaje <sup>35</sup>S (9 partes de DMEM que carece de metionina y cisteína con una parte de DMEM completo, complementado con el 10% de suero bovino fetal dializado, glutamina 4 mM, y 100 µCi/ml de <sup>35</sup>S metionina y cisteína (Translabel, ICN Radiochemicals). Se incubaron las células en este medio durante seis horas tras lo cual se eliminó el medio. Se lavaron las células con PBS y se solubilizaron entonces con 250 µl de tampón de extracción (Brij 98 al 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,5). Se realizaron inmunoprecipitaciones conjuntas incubando 75 µl de los extractos celulares marcados con <sup>35</sup>S con 5 µg de flag-BAFF humano soluble recombinante en 1 ml de DMEM-10% de suero bovino fetal-NaN<sub>3</sub> al 0,1% durante la noche a 4°C. Se añadieron el anticuerpo M2 monoclonal anti-flag, 10 µg, y proteína A-Sepharose y las incubaciones continuaron durante 2 horas. Se recogieron las perlas de Sepharose por centrifugación, se lavaron con tampón FACS, y se resuspendieron en tampón de carga de SDS con beta-mercaptoetanol como agente reductor. Se hirieron las muestras 5 minutos, se centrifugaron brevemente para sedimentar las perlas de Sepharose, y se procesó una alícuota sobre SDS-PAGE. Se incubó el gel con Enlightning (New England Nuclear), se secó, y se expuso a una película a -80°C.

## Resultados

Esta inmunoprecipitación conjunta une flag-BAFF a las perlas de proteína A-Sepharose a través del anticuerpo anti-flag, M2. También precipitará cualquier proteína en el extracto celular que se una a flag-BAFF, y estas proteínas marcadas radiactivamente se detectarán por autorradiografía. Dado que las células 293EBNA no se unen a BAFF, el vector vacío de control muestra el fondo inherente en el procedimiento (figura 8). Cuando los extractos de células transfectadas por TACI se inmunoprecipitan conjuntamente con flag-BAFF, se observa una banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 34 kDa. Este es el peso molecular predicho aproximado para TACI humano de longitud completa (31,2 kDa), una proteína que se une a BAFF. Cuando los extractos de células transfectadas con pJST576 se inmunoprecipitan conjuntamente con flag-BAFF, se observa una banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 12 kDa. El peso molecular predicho para BAFF-R expresado a partir de pJST576 es de 18,9 kDa. Esta disparidad entre los pesos moleculares predichos y observados podría deberse a movilidad electroforética anómala debido a la carga o conformación de BAFF-R. Otra posibilidad es que 12 kDa es un fragmento proteolítico de BAFF-R.

## Ejemplo 9

Este ejemplo describe la generación de formas solubles de BAFF-R. Pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos complementarios a pJST576 para amplificar por PCR el dominio extracelular de BAFF-R en ausencia de dominios transmembrana e intracelular. Normalmente, uno incluye la mayor parte del tallo, o la región de aminoácidos entre el dominio de unión a ligando y el dominio transmembrana. Podría variarse la cantidad de región del tallo incluida para optimizar la potencia del receptor soluble resultante. Este fragmento amplificado se modificaría por ingeniería genética con sitios de restricción adecuados para permitir la clonación a diversas secuencias líder heterólogas sobre el extremo 5' del fragmento a diversos vectores de fusión de quimeras de fusión de Ig en el extremo 3'. Alternativamente, puede insertarse una señal de parada en el extremo 3' del dominio extracelular de BAFF-R y preparar una forma soluble del receptor o usar otra pareja de fusión C-terminal sin recurrir al uso de un enfoque de quimera de fusión. También, podría crearse una proteína de fusión N-terminal que consiste en una pareja de fusión que contiene una secuencia señal seguida por el dominio extracelular N-terminal de BAFF-R. Los vectores resultantes pueden expresarse en la mayor parte de los sistemas usados en biotecnología incluyendo levaduras, células de insectos, bacterias y células de mamíferos y existen ejemplos para todos los tipos de expresión. Pueden unirse diversos dominios de Fc humanos para optimizar o eliminar FcR e interacciones complementarias tal como se desee. Alternativamente, pueden usarse formas mutadas de estos dominios Fc para eliminar selectivamente FcR o interacciones complementarias o la unión de azúcares unidos a N en el dominio Fc que tiene determinadas ventajas. Se muestra un ejemplo de una molécula de fusión BAFF-R:Fc en la figura 9. Esta molécula contiene la secuencia líder de tipo I de un gen de Ig-K murino unida por un sitio de restricción Aat2 al dominio extracelular de BAFF-R (residuos de aminoácidos 2-71 tal como se muestra en la figura 2D) que a su vez está unido por un sitio de restricción Sall al dominio Fc de IgG1 humana.

## Ejemplo 10

En este ejemplo se muestra el perfil de expresión de BAFF-R en tejidos humanos y líneas celulares usando análisis por transferencia de tipo Northern.

## Materiales y procedimientos

Se hicieron crecer diversas líneas de células B y que no eran B en las condiciones apropiadas. Se preparó ARN de aproximadamente 10<sup>7</sup> células usando el kit RNeasy (Qiagen). Se cuantificaron los ARN y se procesaron 20 µg de cada muestra en un gel de formaldehído al 1,2% tal como se describe por Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 1989. Se inmunotransfirió el gel a una membrana de nylon (BMB) y entonces se reticuló

con luz ultravioleta (UV). Se adquirieron de Clontech varios sistemas de transferencia de tipo Northern (multitejido 12 carriles, humano II y sistema inmunitario II). Se hibridaron previamente los filtros a 65°C en tampón ExpressHyb (Clontech) durante 30 min y se hibridaron entonces con un fragmento de EdoNI marcado con <sup>32</sup>P cebado aleatoriamente desde el extremo 3' de JST576 durante aproximadamente 3 horas. Se lavaron los filtros a temperatura ambiente en SSC 2X/ DSD al 0,05% durante 45 min y después a 50°C en SSC 0,1X/ SDS al 0,1% durante 45 minutos. Se expuso el filtro a una película de rayos X durante 4 días usando 2 pantallas de intensificación. Además, se adquirieron de Clontech varios sistemas de transferencia de tipo Northern (multitejido 12 carriles, humano II y sistema inmunitario II), hibridados con la sonda de JST576 y se trataron como anteriormente.

### Resultados

El ARNm para BAFF-R parece expresarse predominantemente en los órganos del sistema inmunitario a este nivel de detección. El nivel más alto es en el bazo y nódulos linfáticos, pero también era evidente ARNm en PBL, timo, intestino delgado y colon (figuras 10A, B y C). El tamaño aproximado del mensajero es de 4,5 kb; parece haber dos poblaciones de ARNm en las muestras cuando el gen no se expresa excesivamente. Pueden existir dos ARNm en el bazo y nódulos linfáticos también. Esto puede indicar que BAFF-R tiene sitios de adición de poliA alternativos o que el ARN experimenta corte y empalme alternativo. Cuando se examinan varias líneas celulares para detectar la presencia de ARNm de BAFF-R, se detecta el mismo ARNm de 4,5 kb. Sólo las líneas de células B expresan ARNm de BAFF-R (figura 11). No se detecta ARNm en las líneas celulares U266, RPMI8226, RPMI8226 y Daudi o en las líneas de células que no son B examinadas.

### Ejemplo 11

Se muestra en este ejemplo que la expresión de JST576 está restringida a las líneas celulares que se unen a BAFF.

### Materiales y procedimientos

Se adquirieron líneas celulares de la ATCC y se hicieron crecer en las condiciones indicadas. Se hicieron crecer diversas líneas de células B y que no eran B en las condiciones apropiadas. Se preparó ARN de aproximadamente 10<sup>7</sup> células usando el kit RNeasy (Qiagen). Se cuantificaron los ARN y se procesaron 20 µg de cada muestra en un gel de formaldehído al 1,2% tal como se describe por Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 1989. Se inmunotransfirió el gel a una membrana de nylon (BMB) y entonces se reticuló con luz ultravioleta (UV). Se hibridó el filtro con un fragmento marcado de JST576 y se lavó entonces como en el ejemplo 10. Se comprobó en las células su capacidad de unirse a BAFF usando análisis por FACS. Se recogieron aproximadamente 2,5-5 x 10<sup>5</sup> células, y se lavaron. Se incubó con las células BAFF marcado con FLAG, diluido en PBS + FCS al 5% y azida de sodio al 0,05% (tampón FACS), en todo el intervalo de concentración (8-0,125 µg/ml) durante 30 min en hielo. Se lavaron las células con tampón FACS y se incubaron, durante 30 min, en hielo, con el anticuerpo M2 monoclonal anti-FLAG (Sigma) a 5 µg/ml. Se lavaron de nuevo las células con tampón FACS y se incubaron después con una dilución 1:5000 de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con PE (Jackson Immuno Research) durante 30 min en hielo. Se lavaron las células como anteriormente y se analizaron entonces en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson) usando el software CellQuest.

### Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados de los experimentos de unión a BAFF. Las líneas celulares que se unen a BAFF son Ramos, Namalwa, IM-9, NC-37, Raji, BJAB y SKW6.4. Se indica el nivel de unión por el número de signos +. Las líneas celulares que no se unen a BAFF son U266, RPMI 8226, Daudi, U937, Jurkat, HT29, A549, SW480 y ME260. La capacidad de las líneas celulares para unirse a BAFF está correlacionada con la presencia de ARNm de BAFF-R mostrado en la figura 11.

Tabla 1

Línea celular	Tipo	Unión a BAFF
<b>BJAB</b>	Linfoma de Burkitt	+++
<b>IM-9</b>	IgG de linfoblasto	+++
<b>NC-37</b>	Linfoblasto VEB+	++
<b>Ramos</b>	Linfoma de Burkitt VEB-	++
<b>Raji</b>	Linfoma de Burkitt	++
<b>SKW6.4</b>	IgM de linfoblasto	++
<b>Namalwa</b>	Linfoma de Burkitt	+

(cont.)

<b>Daudi</b>	Linfoma de Burkitt VEB+	-
<b>U266</b>	Plasmacitoma	-
<b>RPMI 8226</b>	Plasmacitoma	-
<b>U937</b>	Monocito	-
<b>Jurkat</b>	Leucemia de célula T	-
<b>HT29</b>	Adenocarcinoma colorrectal	-
<b>A549</b>	Carcinoma de pulmón	-
<b>SW480</b>	Adenocarcinoma colorrectal	-
<b>ME260</b>	Melanoma	-

**Ejemplo 12**

Este ejemplo describe la capacidad de una proteína de fusión huBAFF-R:hulgG1 que se expresa y se secreta en el medio condicionado por células 293EBNA transfectadas transitoriamente para inmunoprecipitar de manera conjunta myc-huBAFF biotinilado soluble recombinante.

**5 Materiales y procedimientos**

Se transfectaron células 293EBNA mediante Lipofectamine 2000 (Life Technologies) con o bien pJST618 que expresa huBCMA:hulgG1 como control positivo para la unión a BAFF, o bien un plásmido que expresa huFN14:hulgG1 como control negativo para la unión a BAFF. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los medios condicionados.

- 10 Se ejecutó la SDS-PAGE mezclando un volumen igual de tampón de ejecución SDS 2X, con o sin agente reductor, con los medios condicionados y se hirvieron durante 5 minutos. Se procesaron entonces las muestras sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 4-20%. Se procesaron cantidades conocidas de hBCMA:Fc en carriles adyacentes para estimar la cantidad de proteína de fusión hlgG1 en los medios condicionados. Se transfirieron las muestras a membranas (Immobilon P, Millipore) mediante inmunotransferencia de tipo Western en tampón CAPS 0,01M pH 11 -
- 15 MeOH al 10%. Se bloquearon las membranas con leche en polvo desnatada al 5% (NFDM) en TBST, se sondaron con una dilución 1:3000 de IgG-HRP de cabra anti-ser humano (Jackson InmunoResearch) durante 1 hora, se lavaron en TBST y se expusieron a una película. Se realizaron las inmunoprecipitaciones conjuntas incubando 200 µl de los medios condicionados con 200 ng de flag-BAFF humano soluble recombinante en 1 ml de DMEM-10% de suero bovino fetal-NaN<sub>3</sub> al 0,1% durante la noche a 4°C. Se añadió proteína A-Sepharose y las incubaciones continuaron durante 2 horas. Se recogieron las perlas de Sepharose por centrifugación, se lavaron con tampón FACS TBST, y se resuspendieron en tampón de carga de SDS con beta mercaptoetanol como agente reductor. Se hirvieron las muestras 5 minutos, se centrifugaron brevemente para sedimentar las perlas de Sepharose, y se procesó una alícuota sobre SDS-PAGE. Se procesó FLAG-huBAFF, 50 ng, como control positivo. Se transfirieron las muestras a membranas de PVDF (Immobilon P, Millipore) mediante inmunotransferencia de tipo Western en tampón
- 20 CAPS 0,01M pH 11/ MeOH al 10%. Se bloquearon las membranas con NFDM-TBST al 5%, se sondaron con M2-HRP anti-FLAG 1 µg/ml durante 1 hora, se lavaron en TBST y se expusieron a una película.

**Resultados**

- La inmunoprecipitación conjunta precipita las diversas fusiones receptor:Fc a través de la pareja de fusión que interactúa con la proteína A Sepharose. También precipitará cualquier proteína que interactúe con las fusiones R:IgG1, tales como la flag-BAFF. Los medios condicionados de células que expresan hBCMA:Fc son capaces de
- 30 inmunoprecipitar conjuntamente flag-BAFF, tal como se esperaba, dado que se observa una banda que migra conjuntamente con flag-BAFF en la inmunotransferencia de tipo Western (figura 12). Los medios condicionados de células que expresan hFN14: Fc no inmunoprecipitan conjuntamente flag-BAFF. Los medios condicionados de células que expresan BAFF-R:Fc son capaces de inmunoprecipitar conjuntamente flag-BAFF. Se observa una banda
- 35 que migra conjuntamente con flag-BAFF en la inmunotransferencia de tipo Western y es de intensidad similar a la inmunoprecipitada conjuntamente por huBCMA: hulgG1.

**Ejemplo 13**

Este ejemplo ilustra la capacidad de una proteína de fusión BAFF-R:Fc, en este caso huBAFF-R (aa 2-71):hulgG1, para bloquear la unión de huBAFF a células BJAB.

**Materiales y procedimientos**

Se generó la fusión huBAFF-R (2-71)-hulgG1 tratada en el ejemplo 9 y se denominó pJST618. Se transfectó este constructo transitoriamente en células 293EBNA y se recogieron los medios condicionados. Se purificó la proteína de fusión mediante elución de ácido a partir de proteína A Sepharose seguido por cromatografía de filtración en gel.

- 5 Se preincubó myc-huBAFF biotinilado, 200ng/ml, con o bien 50 µl de tampón FACS o bien con diluciones en serie de cinco veces, que oscilaban desde 5 µg/ml hasta 200 ng/ml, de huBAFF-R: Fc purificado durante 30 minutos en hielo. Se incubaron entonces células BJAB ( $2,5 \times 10^5$  células) con estas soluciones en hielo durante una hora. Se lavaron las células con tampón FACS y se tiñeron con SAV-PE. Se analizaron las células por FACS para detectar la fluorescencia de PE y se dio formato a los datos como histogramas superpuestos. Alternativamente, se incubó previamente BAFF-biotinilado 200 ng/ml con diluciones en serie de dos veces de o bien hBAFF-R:Fc, hTACI:Fc, o bien hLTBR:Fc. Se tiñeron las células para detectar la unión a BAFF biotinilado como anteriormente.

**Resultados**

La figura 13A muestra el recubrimiento de los histogramas representados para la unión de huBAFF a BJAB en presencia de diversas concentraciones de huBAFF-R:Fc. La línea negra marcada "A" representa la unión de referencia de SAV-PE y la línea roja marcada "E" representa células teñidas con myc-huBAFF biotinilado sin preincubación con BAFF-R:Fc. La preincubación de myc-huBAFF biotinilado con 5 µg/ml de huBAFF-R:Fc da como resultado un desplazamiento en el histograma casi hasta los niveles de referencia (curva B). La preincubación con huBAFF-R-hulgG1 o bien 1 µg/ml (curva C) o bien 200 ng/ml (curva D) dio como resultado un descenso de aproximadamente cuatro veces en la unión de myc-huBAFF biotinilado.

- 20 La figura 13B muestra que tanto BAFF-R:Fc como TACI:Fc pueden bloquear la unión de BAFF a células BJAB. La preincubación con LTBR:Fc no tiene efecto bloqueante sobre BAFF.

**Ejemplo 14**

Este ejemplo describe la capacidad de una proteína de fusión BAFF-R:IgG1 para bloquear la proliferación de células B inducida por BAFF.

- 25 **Materiales y procedimientos**

Para el ensayo de proliferación *in vitro*, se aislaron células B de ratón de los bazos de ratones C57B16 (de 8 semanas de edad) usando una columna de recuperación de células B (columna (Columna de recuperación de células B de ratón Collect™: Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canadá.). Se analizaron las células B purificadas por FACS y se encontró que >90% eran positivas para la tinción con B220. Se incubaron células B en placas de 96 pocillos ( $10^5$  células/pocillo en 50 ml de RPMI complementado con FBS al 10%) durante 72 horas en presencia o ausencia de 2 mg/ml de anticuerpo de cabra anti-cadena m humana (Sigma Chemical Co.); hlgG control (10 mg/ml) huBAFFR:Fc (10 mg/ml). Se sembraron en placas las muestras por triplicado y con las concentraciones indicadas de myc-hBAFF. Se pulsaron las células durante unas 18 horas adicionales con [<sup>3</sup>H]timidina (1 µCi/pocillo) y se recogieron. Se monitorizó la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina mediante recuento de centelleo líquido. Se usó proteína de fusión BAFF-R:Fc humana, producida como en el ejemplo 13, en este ensayo, tal como se trató en el ejemplo 9, y se generó a partir del sobrenadante de células 293EBNA transfectadas con pJST618. Se recogió el sobrenadante, se cargó en una columna de Proteína A, se eluyó con ácido, se neutralizó y se sometió entonces a cromatografía de filtración en gel con el fin de obtener proteína huBAFF-R:Fc libre de agregados. Se expresó el BAFF usado en el ensayo en *Pichia pastoris* y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico seguido por filtración en gel.

**Resultados**

La figura 14 muestra que BAFF puede coestimular el crecimiento de células B en presencia de anticuerpos anti-m (cuadrados) y hlgG (triángulos). BAFF solo (rombos) no puede inducir la proliferación de células B. La incubación con 10 mg/ml de huBAFFR:Fc (estrellas) da como resultado una inhibición completa de la proliferación de células B inducida por BAFF.

- 45 **Ejemplo 15**

**Materiales y procedimientos****Ratones**

Se obtuvieron ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en condiciones de barrera en el "Biogen Animal Facility" (centro de animales de Biogen).

- 50

**Reactivos y régimen de tratamiento**

Las proteínas de fusión del receptor contienen la región Fc de IgG1 humana. Los ratones (5/grupo) recibieron 200 µg de proteínas de fusión (BAFF-R:Fc de ratón o BAFF-R:Fc humana) 2x/semana durante 4 semanas, i.p. (por vía intraperitoneal). Los ratones control recibieron IgG humana policlonal (panglobulina™) (HlgG), 200 µg 2x/semana durante 4 semanas. Tres días después de la última dosis, se extrajo sangre del seno orbital, se sacrificaron entonces los ratones y se extrajeron los bazos, ganglios linfáticos y médula ósea para su análisis.

**Análisis por citometría de flujo**

En el momento del sacrificio se registraron los pesos de los bazos. Se prepararon suspensiones de células únicas a partir del bazo y la sangre tras lisar los glóbulos rojos en una solución hipotónica. También se prepararon suspensiones de células únicas a partir ganglios linfáticos inguinales y médula espinal. Se realizó la citometría de flujo usando AcM dirigidos contra B220, IgM, IgD y CD21. Se definieron subpoblaciones de células B esplénicas como foliculares (B220+, IgM<sup>bajo</sup>, CD2<sup>bajo</sup>), de la zona marginal (B220+, IgM<sup>alto</sup> CD21<sup>alto</sup>) y formadas de nuevo (B220+, IgM<sup>alto</sup> CD21-). En resumen, se incubaron ~1,5 x 10<sup>6</sup> con 10 µg/ml de Fc block (Pharmingen) durante 10 min en hielo para bloquear los receptores de Fc, seguido por la adición de AcM marcados fluorescentemente y se incubaron en hielo durante 30 min. Se lavaron las células 1X y se resuspendieron en paraformaldehído al 0,5%. Se adquirieron los datos de fluorescencia celular en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) y se analizaron usando el software CellQuest (Becton Dickinson).

**Resultados**

Tras un transcurso de tratamiento de 4 semanas con BAFF-R humano o de ratón, hubo una marcada reducción en el peso de los bazos de ratones tratados con BAFF-R:Fc humana y de ratón (figura 15), comparados con ratones tratados con IgG humana de control. Se encontró que el descenso aparente en la celularidad esplénica resultaba de una reducción en el número de células B esplénicas. El número medio de células B esplénicas B220 + en ratones tratados con BAFF-R:Fc humana y de ratón, 1,8 x 10<sup>6</sup> y 2,6 x 10<sup>6</sup> células, respectivamente, se redujo significativamente comparado con el número de células B en animales tratados con HlgG de control, que tenían una media de 19,8 x 10<sup>6</sup> células (figura 16). El examen de las diferentes subpoblaciones de células B esplénicas, foliculares, de la zona marginal y formadas nuevamente, indicó que el número de células B en cada subconjunto se redujo en los ratones tratados con BAFF-R:Fc (tabla 2), aunque las células B foliculares y de la zona marginal tuvieron la mayor reducción.

Tabla 2. El tratamiento con BAFF-R:Fc da como resultado una reducción en las subpoblaciones de células B esplénicas.

	Subpoblaciones de células B esplénicas (10 <sup>6</sup> células ± DE)		
	Foliculares	Zona marginal	Formadas nuevamente
<b>IgG humana</b>	14,5 ± 2,4	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,2
<b>mBAFF-R:Fc</b>	0,7 ± 0,1	0,06 ± 0,02	0,4 ± 0,1
<b>hBAFF-R:Fc</b>	1,4 ± 0,5	0,05 ± 0,02	0,5 ± 0,2

Los ratones recibieron 200 µg de HlgG, mBAFF-R:Fc o hBAFF-R:Fc en los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. Se sacrificaron los ratones en el día 28 y se extrajeron los bazos para el análisis de los subconjuntos de células B.

El examen del tanto por ciento de células B B220+ contenidas en los ganglios linfáticos inguinales (GL) mostró que las poblaciones de células B medias se redujeron marcadamente en ratones tratados con BAFF-R:Fc humana y de ratón, el 12,3% ± 1,4 y el 18,6% ± 1,3, respectivamente, comparado con ratones tratados con HlgG de control que tenían una media del 30,8% ± 4,1 de células B (figura 17). Se obtuvieron resultados similares cuando se examinaron células B de la sangre periférica. El 42,5% ± 4,5 de los linfocitos de ratones tratados con IgG humana eran células B, mientras que sólo el 21,2% ± 6,1 y el 8,3% ± 4,5 de los linfocitos eran células B de ratones tratados con BAFF-R:Fc humana y de ratón, respectivamente (figura 18).

Aunque se redujeron las poblaciones de células B maduras y de células B formadas nuevamente (inmaduras) en los ratones tratados con BAFF-R:Fc, los precursores de células B en la médula ósea permanecieron sin afectar (datos no mostrados).

**Discusión**

Estos resultados sugieren que el boqueo in vivo de BAFF con una proteína de fusión del receptor BAFF-R conduce a la inhibición de la maduración y/o supervivencia de las células B.

Estos resultados sugieren también el posible uso de una proteína de fusión de BAFF-R como un fármaco terapéutico con aplicaciones clínicas en enfermedades mediadas por células B. Las enfermedades incluirían las de naturaleza autoinmunitaria tales como lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poli-arteritis nodosa y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Este agente terapéutico también tendría aplicación en trastornos de células plasmáticas tales como mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, amiloidosis primaria o asociada con inmunocitos, y gammopatía monoclonal de significancia indeterminada (MGUS). Las dianas oncológicas incluirían linfomas, leucemias y carcinomas de células B.

#### 10 **Ejemplo 16:**

En este ejemplo, se describe la caracterización de un panel inicial de anticuerpos monoclonales de ratón preparados contra el dominio extracelular de BAFF-R. Todos los anticuerpos reconocen el dominio extracelular de BAFF-R, y un subconjunto de estos anticuerpos tiene propiedades antagonistas ya que evitan la unión posterior de BAFF a BAFF-R.

#### 15 **Materiales y procedimientos**

Se inmunizaron y reforzaron ratones RBF con huBAFF-R:Fc. Se fusionaron los esplenocitos de los ratones inmunizados con la cepa FL653 de mieloma de ratón, una derivado de la cepa P3-X63-Ag8.653 para generar hibridomas mediante tecnologías habituales.

Se sometió a ensayo por FACS los medios condicionados de clones de hibridomas que secretaban anticuerpos contra el dominio extracelular de huBAFFR. Se realizaron los ensayos de unión a FACS en células 293EBNA cotransfectadas con plásmidos que expresaban GFP o muBAFF-R o huBAFF-R de longitud completa como en el ejemplo 5. Se diluyeron los medios condicionados de hibridoma 1:10 en tampón FACS y se incubaron con las células transfectadas durante 30 min en hielo. Se lavaron las células con tampón FACS y se reveló la unión mediante incubación con una dilución 1:100 de anticuerpo anti-IgG de ratón (H + L) (Jackson InmunoResearch) durante 30 min en hielo. Se lavaron de nuevo las células con tampón FACS y se resuspendieron en paraformaldehído al 1% en tampón FACS. Se analizaron las células por FACS para detectar la fluorescencia de GFP y PE y se dio formato a los datos en un gráfico de puntos de cuatro cuadrantes tal como se describió en el ejemplo 5. Se realizaron los ensayos de bloqueo de BAFF incubando AcM anti-BAFF-R de proteína A purificada 10 µg/ml o anticuerpo control (MOP C21) con células BJAB durante 30 min en hielo. Tras el lavado, se incubaron las células con huBAFF biotinilado 250 ng/ml durante 30 min en hielo. Se lavaron de nuevo las células y se reveló la unión a BAFF mediante incubación con SAV-PE. Se analizaron las células por FACS para detectar la fluorescencia de PE y se representaron los datos como histogramas superpuestos.

#### **Resultados:**

Se observó que los sobrenadantes de diez clones se unían a células transfectadas con huBAFF-R. Se muestran en la figura 19A los gráficos de puntos de los datos de FACS de cuatro de los diez sobrenadantes de anti-BAFF-R. La eficacia de transfección fue de aproximadamente el 50%, desplazándose hacia el cuadrante superior derecho casi todas las células transfectadas tras la tinción con los sobrenadantes. Ninguno de estos diez sobrenadantes se unió a células 293EBNA transfectadas con muBAFFR (datos no mostrados). Se sometieron a prueba los medios condicionados de los clones que fueron positivos para la unión a BAFF-R para detectar su capacidad de boquear la interacción de BAFF con BAFF-R expresado sobre la superficie de células BJAB. Las células BJAB expresan BAFFR sobre su superficie, y expresan cantidades no detectables de BCMA o TACI (Thompson *et al.* (2001) Science Aug 16). Dos de los diez hibridomas, los clones 2 y 9, produjeron AcM que podían bloquear la interacción de BAFF-R con BAFF. (Se depositó el clon 2 en la ATCC el 6 de septiembre de 2001 como "clon número 2.1 anti-BAFF-R (isotipo IgG1-kappa) y se le asignó el número de la ATCC PTA-3689; se depositó el clon 9 en la ATCC el 6 de septiembre de 2001 como "clon número 9.1 anti-BAFF-R" (isotipo IgG1-kappa) y se le asignó el número de la ATCC PTA-3688). Las superposiciones de los histogramas en la figura 19B muestran que la preincubación de 10 µg/ml de o bien el clon 2 de AcM (curva (b)) o bien el 9 (curva (c)) desplaza la curva de unión a BAFF más de diez veces hacia la izquierda, casi hasta la señal del control que no es BAFF (curva (a)). El histograma más a la derecha (curva (d)) indica el desplazamiento cuando se incubaron AcM control MOP C21, AcM no bloqueantes anti-BAFF-R o nada de proteína con las células antes de la unión a BAFF.

#### **Ejemplo 17:**

Este ejemplo describe la caracterización de la construcción, secuencia y proteína de las sustituciones de aminoácidos en hBAFF-R(2-71)-Fc que dan como resultado un aumento de solubilidad de la molécula expresada de manera recombinante.

55

## Materiales y procedimientos

Se usaron cassettes de oligonucleótidos de cadena doble con extremos cohesivos para introducir sustituciones en residuos elegidos como diana mediante ligación en los mismos sitios del gen de hBAFF-R(2-71):IgG1.

5 Se transfectaron plásmidos de expresión en células 293EBNA usando Lipofectamine 2000 como en el ejemplo 5. Se determinó la agregación ejecutando SDS-PAGE no reductora de medios condicionados 20 horas tras la transfección, seguido por inmunotransferencia de Western, y detección con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP (1:100, Jackson InmunoResearch) y detección con ECL como en el ejemplo 12..

10 Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación utilizando 100 µl de medios condicionados 20 horas tras la transfección en 1 ml de DMEM/FBS al 10%/NaA3 al 0,2% con 200 ng de flag-huBAFF. Se sacudieron las muestras durante 30 min a 4°C, se añadieron 30 µl de proteína A-Sepharose por tubo y se continuó sacudiendo durante otros 30 minutos. Se centrifugaron las perlas de Sepharose y se lavaron tres veces con 1 ml de PBS frío. Se resuspendieron las perlas en tampón reductor de SDS 2X y se cargaron en geles de acrilamida al 4-20%. Tras la inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió previamente, se reveló la capacidad para inmunoprecipitar flag-BAFF mediante incubación de los filtros con anticuerpo anti-flag M2 conjugado con HRP 1 µg/ml (Sigma) seguido por detección por ECL.

## Resultados

20 Mientras que BAFF-R:Fc humana está sumamente agregada, la BAFF-R:Fc murina está sólo ligeramente agregada (<10%). El análisis de delección ha mostrado que puede deleccionarse el resto de BAFF-R C-terminal completo desde A71 hasta V36 (la última Cys del dominio rico en cisteína (CRD) es C35) sin reducción en la formación de agregado. Esto podría implicar que se requiriesen las regiones N-terminal y CRD de hBAFFR para la formación de agregado.

25 Inicialmente, se generaron varias quimeras de BAFF-R:Fc murina-humana en las que se sustituyeron diversas cantidades de la secuencia de BAFF-R humana N-terminal con la secuencia murina homóloga y se analizaron para detectar el efecto sobre la agregación proteica. Se muestra en la figura 20 la secuencia de aminoácidos para esta y posteriores sustituciones en hBAFF-R:Fc. Esta figura muestra el resto de BAFF-R tanto de "tipo natural" humano (figura 9) como BAFF-R:Fc murina, con la numeración correspondiente a los residuos de aminoácidos de BAFF-R humano (figura 2d) (SEQ ID N.º: 5) o murino (Figura 4b) (SEQ ID N.º: 9) de longitud completa. La figura 20 muestra también los clones de hBAFF-R:Fc con sustituciones, con los residuos sustituidos indicados en caracteres subrayados, rojos, en negrita. Las quimeras que contenían menos de los primeros 21 residuos murinos (Q21) antes de cambiarlos por humanos parecían agregarse de manera similar a hBAFF-R:Fc de tipo natural; sin embargo, las que contenían al menos los primeros 39 residuos murinos se agregaban de una manera marcadamente reducida, similar a mBAFF-R. De los nueve residuos adicionales diferentes entre estos dos constructos de BAFF-R:Fc quiméricos, cuatro de ellos difieren entre ser humano y ratón. Esto implicaría que al menos uno de los residuos humanos entre C19 y L27, una región interna para el CRD, se requeriría para la agregación.

35 Se prepararon mediante técnicas convencionales constructos que sustitúan los residuos humanos por los murinos correspondientes en sólo estos 4 sitios o un subconjunto de los mismos. Cuando sólo se sustituyeron los 4 residuos V20N P21Q A22T L27P en el resto de BAFFR humano, este BAFF-R:Fc modificado no se agregó. hBAFF-R(V20N P21Q A22T L27P):Fc todavía podía interactuar con BAFF tal como se analizó por inmunoprecipitación. La sustitución V20N L27P también redujo la agregación de hBAFF-R:Fc desde aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 10%. Se observaron niveles intermedios de agregación con P21QL27P (40%), L27P (60%), V20N L27A (60%) y V20N L27S (60%). Ninguna de las siguientes sustituciones disminuyó la agregación proteica: V20N P21 Q A22T; V20N A22T; V20N P21 Q; V20N; y P21 Q.

## Ejemplo 18

Este ejemplo describe que p21-Arc es una proteína asociada con BAFF-R. El procedimiento usado para determinar tal interacción fue la inmunoprecipitación.

## 45 Procedimientos

Se preparó un constructo que contenía el ADNc que codificaba para el dominio intracelular de BAFF-R (BAFF-R-i.c.d.) con una marca myc fusionada en el extremo N-terminal y se subclonó en el plásmido CH269 en los sitios NheI (5') y XhoI (3'). Se transfectaron células 293E con este constructo y se lisaron 72 horas después con tampón de lisis que contenía NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Na3VO4 1 mM, NaF 50 mM y Brij 97 al 1%. Se clarificaron los lisados celulares con una centrifuga de sobremesa a 10.000 g durante 5 minutos y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo monoclonal anti-myc, 9E10. Se separaron los inmunoprecipitados mediante una SDS-PAGE al 10-20% en condiciones reductoras y se inmunotransfirieron en trans sobre una membrana de PVDF. Se visualizaron las proteínas inmunotransferidas con solución de Ponceau S al 0,2% y se extirparon las zonas correspondientes a las proteínas asociadas específicamente con BAFF-R y se sometieron a análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminales. Se realizó una búsqueda ambigua en la base de datos de proteínas no redundantes usando el algoritmo PATTERN SEARCH para los datos de la secuencia N-terminal obtenidos.

**Resultados**

Una de las proteínas asociada específicamente con el dominio citoplasmático de BAFFR marcado con myc tiene un peso molecular aparente de 21 kDa. Se identificó esta proteína de manera no ambigua como p21-Arc (complejo proteico relacionado con actina). P21-Arc es un componente de una proteína de siete subunidades denominado complejo Arp2/3 que se mostró que estaba implicado en la polimerización de la actina (Welch *et al.* (1997) J. Cell Biol. 138: 357). Recientemente, se notificó que una proteína de unión a actina, la filamina, estaba asociada con el factor 2 asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2) (Leonardi *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275: 271). Por tanto, la identificación de p21-Arc en los inmunoprecipitados conjuntos del dominio citoplasmático de BAFFR sugiere que p21-Arc está o bien directamente asociada con BAFFR o bien indirectamente asociada con BAFFR mediante su asociación con TRAF2 y/o otra proteína TRAF que, a su vez, se asocia con BAFFR.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen Idec MA, Inc.

<120> Ácidos nucleicos y polipéptidos de receptor

15

<130> BIO11748PCTEPD1

<140> EP 07 105 107.2

<141> 28-03-2007

20

<150> EP 01 968 621

<151> 06-09-2001

<150> PCT/US01/28006

25 <151> 06-09-2001

<150> 60/233.152

<151> 18-09-2000

30 <150> 60/234.140

<151> 21-09-2000

<150> 60/268.499

<151> 13-02-2001

35

<150> 60/312.185

<151> 14-08-2001

<160> 37

<170> Patente versión 3.1

40 <210> 1

<211> 1201

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 1

ES 2 388 153 T3

gcacatgag gcgagggccc cggagcctgc ggggcagggg cgcgccagcc cccacgcctt 60  
 gcgtcccggc cgagtgtctc gacctgtctg tccgccactg cgtggcctgc gggctcctgc 120  
 gcacgccgcg gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc 180  
 ggggagaacg gggccccgat cgccagggcg caggcagagc cccgaccccc gggggcgccg 240  
 agggctgaaa ggaccctgtg ggcagggcct ggaggggccc gcgatcaccg cgtggccttc 300  
 accgcegcct ctctccctcc ccttgtccac cgcccccggt ctgtccctcc cctccccggc 360  
 cagcctcgcc cccctccgcc cctccccgtc cccgctcctc cctccccctg gccccctggc 420  
 ctccctccct gtccccctcc gaagcagccg gggccagcag ccctgcgccc aggacggcgc 480  
 tgcagccgca ggagtcggtg ggcgcggggg ccggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc 540  
 tgctctttgg cgcccccgcg ctgctgggccc tggcactggt cctggcgctg gtcctggtgg 600  
 gtctggtgag ctggaggcgg cgacagcggc ggcttcgcgg cgcgtcctcc gcagaggccc 660  
 ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggt catcattctg tctccgggaa 720  
 tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctccctgggga agaccagga accacccac 780  
 ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca 840  
 agacggccgg ccctgagcaa caatagcagg gagccggcag gaggtggccc ctgccctccc 900  
 tctggacccc cagccagggg cttggaaatc aaattcagct cttcactcca gcatgcacat 960  
 gccctctttc tgggaccagg ctaaccctgc agaagcacag aactacaga ccacagcatt 1020  
 cagcccccat ggagtttggg gtgcttgctt ttggcttcag acctacat ctttgacagc 1080  
 ccttgaaggt ggtagcccag ctctgttcc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag 1140  
 taaaagaccg cttttaaatt ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaaga 1200  
 c 1201

<210> 2

<211> 992

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 388 153 T3

gtcgaccac gcgtccgccc acgcgtccgg tgcggcggcg tcggcaccat gaggcgaggg 60  
 ccccgagacc tgcggggcag ggacgcgcca gccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc 120  
 ttcgacctgc tgggtccgcca ctgcgtggcc tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa 180  
 ccgggtaagg gggaccacg gggcgcgcgg cgcggcagc tgcggggaga acggggcccc 240  
 gatcgccagg gcgcaggcag agccccgacc cccgggggcg ccgagggctg aaaggacct 300  
 gtgggcaggg cctggagggg cccgcgatca ccgcgtggcc ctcaaccgccc cctctctccc 360  
 tccccctgtc caccgcccc cggtctgccc tccccctccc ggccagcctc gccccctcc 420  
 gccctcccc gtccccgctc ctccccctcc tgggccccct ggctccctc cctgtcccc 480  
 cccgaagcag ccggggccag cagccctgcg ccaggacgg cgtgcagcc gcaggagtgc 540  
 gtgggcgcgg gggccggcga gggcgcgctg cccctgccc ggtctctctt tggcgcccc 600  
 gcgctgctgg gcctggcact ggtcctggcg ctggctctgg tgggtctggt gagctggagg 660  
 cggcgacagc gggcgcttcg cggcgcgtcc tccgcagagg cccccgacgg agacaaggac 720  
 gccccagac ccctggacaa ggtcatcatt ctgtctccgg gaatctctga tgccacagct 780  
 cctgcctggc ctctctctgg ggaagacca ggaaccacc cacctggcca cagtgtccct 840  
 gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag 900  
 caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgcct cctctggac cccagccag 960  
 gggcttgaa atcaaattca gctcttcaact cc 992

<210> 3

<211> 906

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggcgcgccgc accatgagggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60  
 cacgccctgc gtcccggccg agtgcttctga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120  
 gctcctgcgc acgcgcgggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgcccaggac 180

ES 2 388 153 T3

ggcgctgcag ccgcaggagt cgggtggcgc gggggccggc gaggcggcgc tgcccctgcc 240  
 cgggctgctc tttggcgcgc ccgcgctgct gggcctggca ctggtcctgg cgctggctct 300  
 ggtgggtctg gtgagctgga ggcggcgaca gcggcggtt cgggcgcgt cctccgcaga 360  
 ggccccgcac ggagacaagg acgccccaga gccctggac aaggtcatca ttctgtctcc 420  
 gggaatctct gatgccacag ctctgcctg gcctcctcct ggggaagacc caggaaccac 480  
 cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac 540  
 caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcagggagcc ggcaggaggt ggccccctgcc 600  
 ctccctctgg acccccagcc aggggcttgg aatcaaatt cagctcttca ctccagcatg 660  
 cacatgcctc ttttctggga ccaggtaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca 720  
 gcattcagcc cccatggagt ttggtgtgct tgcctttggc ttcagacctc accatctttg 780  
 acagcccttg aaggtgtag cccagctcct gttcctgtgc cttcaaaagg ctggggcact 840  
 atgagtaaaa gaccgctttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaaat gaatctgaaa 900  
 aaagac 906

<210> 4

<211> 903

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60  
 cacgccctgc gtcccggccg agtgtctcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120  
 gctcctgcgc acgcccgggc cgaaaocggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc 180  
 gctgcagccg caggagtccg tgggcgcggg ggcggcgag gcggcgctgc ccctgcccgg 240  
 gctgctcttt ggcgcccccg cgctgctggg cctggcactg gtccctggcgc tggctcctggt 300  
 gggctctggtg agctggaggc ggcgacagcg gcggcttcgc ggcgcgtcct ccgcagaggc 360  
 ccccgacgga gacaaggacg ccccagagcc cctggacaag gtcattctc tgtctccggg 420  
 aatctctgat gccacagctc ctgcctggcc tcctcctggg gaagaccag gaaccacccc 480  
 acctggccac agtgtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtgaccac 540  
 caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggaggtggc ccctgcctc 600  
 cctctggacc cccagccagg ggcttgaaa tcaaattcag ctcttcactc cagcatgcac 660  
 atgccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720  
 ttcagcccc atggagtctg gtgtgcttgc ctttggcttc agacctcacc atctttgaca 780  
 gcccttgaag gtggtagccc agctcctggt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840  
 agtaaaagac cgctttttaa atggggaagg caccattaag ccaaatgaa tctgaaaaaa 900  
 gac 903

ES 2 388 153 T3

<210> 5

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 5

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys  
20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Ala Gly  
35 40 45

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val  
50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe  
65 70 75 80

Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu  
85 90 95

Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala  
100 105 110

Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu  
115 120 125

Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro  
130 135 140

Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His  
145 150 155 160

Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr  
165 170 175

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln  
180 185

<210> 6

<211> 1187

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

ES 2 388 153 T3

<400> 6

```

ggggcctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aaccgggag      60

gcagagcttg cagtgagccg agatagcgcc attgcactcc agcctgggcg acagagcgag    120
actccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aagggggggc ccaggcgagc tcggtcccac    180
ccagcaggcg ggggcggggc agggcagagt gctcccccg cccccgctt cctccccgag    240
ggccccggag cccagctcag cctcagtcce cgcagcttgt gcggcggcgt cggcaccatg    300
aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccagcc ctgctccccg    360
gccgagtget tcgacctgct ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgccg    420
cggccgaaac cggccggggc cagcagccct gcgccagga cggcctgca gccgcaggag    480
tcggtgggcg cgggggcccg cgaggcggcg ctgccccctgc cgggctgct ctttggcgcc    540
cccgcctgce tgggcctggc actggctctg gcgctggctc tgggtgggtct ggtgagctgg    600
aggcggcgac agcggcggct tcgcgggcg tccctccgag agggcccca cggagacaag    660
gacgccccag agccccctga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca    720
gctcctgcct ggctcctcc tggggaagac ccaggaacca cccacactgg ccacagtgtc    780
cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactgggta ccaccaagac ggccggcct    840
gagcaacaat agcaggggag cggcaggagg tggccccctgc cctccctctg gacccccagc    900
caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgcc tctttctggg    960
accaggctaa ccctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag   1020
tttgggtgtc ttgcctttgg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaagggtgta   1080
gccagctcc tgttctgtg cttcaaaaag gctggggcac tatgagtaaa agaccgcttt   1140
taaaatgggg aaggcaccat taagcaaaa tgaatctgaa aaaagac                   1187

```

<210> 7

5 <211> 266

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

Thr Arg Glu Ala Glu Leu Ala Val Ser Arg Asp Ser Ala Ile Ala Leu
1          5          10          15

Gln Pro Gly Arg Gln Ser Glu Thr Pro Ser Gln Lys Lys Lys Lys Lys
20          25          30

Arg Lys Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser His Pro Ala Gly Gly Gly
35          40          45

Gly Ala Gly Gln Ser Ala Pro Pro Ala Pro Arg Phe Leu Pro Glu Gly
50          55          60

Pro Gly Ala Gln Leu Ser Leu Ser Pro Arg Ser Leu Cys Gly Gly Val

```



ES 2 388 153 T3

gctccgcgct gagaccggac gtggcgctgc tcgtcgggtgc ccccgcactc ctgggactga 300  
 tactggcgct gaccctgggtg ggtctagtga gtctgggtgag ctggagggtgg cgtcaacagc 360  
 tcaggacggc ctccccagac acttcagaag gagtccagca agagtccctg gaaaatgtct 420  
 ttgtaccctc ctcagaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctccg ctcaaagaag 480  
 atgcagacag cgccttgcca cgccacagcg tcccgggtgcc cgccacagaa ctgggctcca 540  
 ccgagctggg gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtgagg aggctggaac 600  
 ccagggatct ctactgggct tgtggacttc acccaacagc ttgggaaaga acttggccct 660  
 tcagtgcagg agtcccttgc ctggggggcg aaccggcag aaccagacac tacaggccac 720  
 atgagattgc ttttgtgtta gctcttgact tgagaacggt ccatttctga gatggttttt 780  
 aagcctgtgt gccttcagat ggttgatag acttgagggt tgcataatta atctctgtag 840  
 tgagtcggag actggaaact taatctcgtt ctaaaaattt tggattactg ggctggagggt 900  
 atggctcagc agttcggttt gtgtgctggt ctagccgagg actccagttg ttcagcttcc 960  
 cggaaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccctgga acatccttgc 1020  
 ctccaaaggc accagcactc atttgctcta gagcacacac acacacacac acacacacac 1080  
 acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggct 1140  
 ggagaaattc atgggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca 1200  
 gaatgcactg cgggtggctc attactgagc ataacttttg cttcagggga cctgatgcct 1260  
 ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac 1320  
 acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcatgggtgg 1380  
 tacacacctt taatcccaac attggggaag caaaggcagg caggtaactg agttggaggc 1440  
 catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagtctc 1500  
 aaaataatac tccccccca aaaaaaaaaa acttttaaat tttgattttt ttcttttatt 1560  
 attatttttt atattaattt catgggtgtt agaagtggta tacttagatg gtgactaaga 1620  
 ggaggtaaag ccatcaggac tgagccccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac 1680  
 acgcccctct cctgctgtgt gccagctctg gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg 1740  
 tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt 1800  
 tagccttagg tgttttgtta cgggtatata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag 1860  
 aagcttttct ttgagctggg aaaggtactg ttaaaccaaa attaactga ataaaaaaaa 1920  
 gctaagggga agacacttaa aaa 1943

<210> 9

<211> 175

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 388 153 T3

Met Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val  
 20 25 30

Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His  
 35 40 45

Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser  
 50 55 60

Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser  
 85 90 95

Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu  
 100 105 110

Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala  
 130 135 140

Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu  
 145 150 155 160

Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln  
 165 170 175

<210> 10

<211> 184

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro  
 1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys  
 20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala  
 35 40 45

ES 2 388 153 T3

Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly  
50 55 60

Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly  
65 70 75 80

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val  
85 90 95

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser  
100 105 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp  
115 120 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala  
130 135 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser  
145 150 155 160

Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr  
165 170 175

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln  
180

<210> 11

<211> 963

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> sig\_péptido

<222> (1)..(63)

<223> codifica para el péptido señal

10 <220>

<221> misc\_feature

<222> (64)..(66)

<223> introduce un sitio de restricción

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (67)..(276)

<223> codifica para la región extracelular de BAFF-R

<220>

<221> misc\_feature

<222> (277)..(279)

<223> introduce un sitio de restricción

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> (280)..(960)

<223> codifica para Fc de IgG1 humana

<400> 11

```

atgggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgtcaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc cacgccctgc      120
gtcccggccc agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg gctcctgcgc      180
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccc      240
caggagtccg tgggcgcggg ggcggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgcccc      300
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacce      360
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc      420
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      480
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      540
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc      600
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag      660
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc      720
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc      780
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt ctctctctac      840
agcaagctca ccgtggaaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg      900
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa      960
tga                                                                                   963
    
```

10 <210> 12

<211> 320

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> SEÑAL

<222> (1)..(21)

<223> secuencia señal

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (22)..(22)

<223> codificado por la región que introduce el sitio de restricción

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (23)..(92)

5 <223> dominio extracelular de BAFF-R

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> codificado por la región que introduce el sitio de restricción

10 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (94)..(320)

<223> Fc de IgG1 humana

<400> 12

ES 2 388 153 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg  
 20 25 30

Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu  
 35 40 45

Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro  
 50 55 60

Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr  
 85 90 95

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 145 150 155 160

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 165 170 175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 180 185 190

ES 2 388 153 T3

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 195 200 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 210 215 220

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 225 230 235 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 245 250 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 260 265 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 275 280 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 290 295 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 305 310 315 320

<210> 13

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 14

<211> 65

<212> PRT

ES 2 388 153 T3

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser  
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg  
20 25 30

Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His Thr  
35 40 45

Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser Ala  
50 55 60

Leu  
65

<210> 15

5 <211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (1)..(1)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

15 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> sustitución

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> sustitución

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> sustitución  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (10)..(10)  
 5 <223> sustitución  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> sustitución  
 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> sustitución  
 <400> 15

Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Gln	Arg	Ser	Arg	Asp	Ser	Pro
1				5					10					15	
Ala	Pro	Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg
			20					25					30		
His	Cys	Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro	Ala
		35					40					45			
Gly	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln	Glu	Ser
		50				55					60				
Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala							
65					70										

15 <210> 16  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> sustitución  
 <220>  
 25 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> sustitución

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> sustitución

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> sustitución

<220>

10 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (16)..(16)  
 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE  
 <222> (17)..(17)

20 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> sustitución

25 <400> 16

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg  
 20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala  
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser  
 50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 17

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> sustitución

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (5)..(5)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

20 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> sustitución

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> sustitución

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> (15)..(15)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> sustitución

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> sustitución

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (20)..(20)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (22)..(22)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

20 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> sustitución

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 17

ES 2 388 153 T3

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg  
 20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala  
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser  
 50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 18

<211> 73

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> sustitución

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> sustitución

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (6)..(6)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

25 <223> sustitución

<220>

- <221> VARIANTE
- <222> (10)..(10)
- <223> sustitución
- <220>
- 5 <221> VARIANTE
- <222> (12)..(12)
- <223> sustitución
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> (15)..(15)
- <223> sustitución
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (16)..(16)
- 15 <223> sustitución
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (17)..(17)
- <223> sustitución
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (20)..(20)
- <223> sustitución
- <220>
- 25 <221> VARIANTE
- <222> (22)..(22)
- <223> sustitución
- <220>
- <221> VARIANTE
- 30 <222> (23)..(23)
- <223> sustitución
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (24)..(24)
- 35 <223> sustitución
- <220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<220>

5 <221> VARIANTE

<222> (33)..(33)

<223> sustitución

<400> 18

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg  
 20 25 30

Asn Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala  
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser  
 50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

10 <210> 19

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (23)..(23)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24) .. (24)

25 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

ES 2 388 153 T3

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 19

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

5

<210> 20

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

<220>

15

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

20

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 20

ES 2 388 153 T3

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 21

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

<223> sustitución

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 21

ES 2 388 153 T3

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 22

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 22

15 Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 23

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (24)..(24)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

15 <223> sustitución

<400> 23

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 24

<211> 70

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

25 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 24

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

5

<210> 25

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 25

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

15

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala

50

55

60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

<210> 26

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

<400> 26

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ser Leu Val Arg His Cys Val  
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
65 70

15

<210> 27

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> sustitución

5 <400> 27

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ala Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 28

<211> 70

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

<223> sustitución

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> sustitución

<400> 28

ES 2 388 153 T3

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 29

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> sustitución

<400> 29

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

15

<210> 30

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

5 <223> sustitución

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

<223> sustitución

10 <400> 30

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 31

<211> 70

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

20 <223> sustitución

<400> 31

ES 2 388 153 T3

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 32

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

<223> sustitución

10 <400> 32

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala  
 50 55 60  
 Gly Ala Gly Glu Ala Ala  
 65 70

<210> 33

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 33  
 ggccgagtc ttcgacctg t 21  
 <210> 34  
 5 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 10 <400> 34  
 gtccgccac tgcgtggcct g 21  
 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 35  
 caccaagacg gccggcctg a 21  
 20 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 36  
 gggcgctac aatctcagct a 21  
 <210> 37  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 37  
 35 ggccgaccag caggtcgaag cactc 25

**REIVINDICACIONES**

1.- Un polipéptido BAFF-R (receptor de factor de activación de células B de la familia de TNF) para su uso en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R, en el que el polipéptido BAFF-R comprende:

- 5 (a) SEQ ID N.º: 10;
- (b) un fragmento de SEQ ID N.º: 10 que se une a BAFF;
- (c) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 70% a SEQ ID N.º: 10 o un fragmento de SEQ ID N.º: 10;
- 10 (d) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 80% a SEQ ID N.º: 10 o un fragmento de SEQ ID N.º: 10;
- (e) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 90% a SEQ ID N.º: 10 o un fragmento de SEQ ID N.º: 10;
- (f) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 95% a SEQ ID N.º: 10 o un fragmento de SEQ ID N.º: 10; o
- 15 (g) SEQ ID N.º: 10 o un fragmento de SEQ ID N.º: 10, modificado por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en el que la secuencia modificada se une a BAFF.

2.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende:

- (a) los aminoácidos 19-35 de SEQ ID N.º: 5;
- 20 (b) los aminoácidos 19-35 de SEQ ID N.º: 5 modificados por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en el que la secuencia modificada se une a BAFF;
- (c) SEQ ID N.º: 13; o
- (d) SEQ ID N.º: 13 modificada por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en la que la secuencia modificada se une a BAFF.

3.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 1, en el que el polipéptido BAFF-R comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID N.º: 15;
- (b) SEQ ID N.º: 16;
- (c) SEQ ID N.º: 17;
- (d) SEQ ID N.º: 18;
- 30 (e) SEQ ID N.º: 19;
- (f) SEQ ID N.º: 20;
- (g) SEQ ID N.º: 21;
- (h) SEQ ID N.º: 22;
- (i) SEQ ID N.º: 23;
- 35 (j) SEQ ID N.º: 24;
- (k) SEQ ID N.º: 25;
- (l) SEQ ID N.º: 26;
- (m) SEQ ID N.º: 27;
- (n) SEQ ID N.º: 28;
- 40 (o) SEQ ID N.º: 29;
- (p) SEQ ID N.º: 30;

- (q) SEQ ID N.º: 31;
- (r) SEQ ID N.º: 32;
- (s) un fragmento de una cualquiera de (a) - (r) que se une a BAFF; y
- (t) una cualquiera de (a) - (s) modificada por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en la que el polipéptido modificado se une a BAFF.
- 5
- 4.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 3, en el que el polipéptido BAFF-R comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) SEQ ID N.º: 19;
- (b) SEQ ID N.º: 22;
- 10 (c) SEQ ID N.º: 24;
- (d) SEQ ID N.º: 25;
- (e) SEQ ID N.º: 26;
- (f) SEQ ID N.º: 27; y
- (g) un fragmento de una cualquiera de (a) - (f) que se une a BAFF.
- 15
- 5.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido BAFF-R se une a BAFF y tiene una propensión reducida a la agregación comparado con el polipéptido BAFF-R nativo correspondiente, y comprende:
- (a) SEQ ID N.º: 5 o SEQ ID N.º: 10, en las que uno o más aminoácidos no conservados en la región de C 19- L27 del polipéptido BAFF-R nativo se sustituyen por aminoácidos correspondientes de un polipéptido BAFF-R de SEQ ID N.º: 9; o
- 20 (b) un fragmento de (a) que se une a BAFF.
- 6.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 5, en el que las sustituciones se introducen en una o más de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) V20, P21, A22 y L27 de SEQ ID N.º: 10;
- 25 (b) V41, P42, A43 y L48 de SEQ ID N.º: 12; y
- (c) de C19 a L27 de un fragmento de SEQ ID N.º: 10 que comprende los aminoácidos 2 - 71.
- 7.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 6, en el que el polipéptido BAFF-R comprende los aminoácidos 2- 71 de SEQ ID N.º: 10, en el que los aminoácidos alterados se seleccionan del grupo que consiste en
- (a) V20N, P21Q, A22T y L27P;
- 30 (b) V20N y L27P;
- (c) P21Q y L27P;
- (d) L27P;
- (e) V20N y L27A; y
- (f) V20N y L27S.
- 35
- 8.- El polipéptido BAFF-R de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido es una proteína quimérica.
- 9.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 8, en el que el polipéptido BAFF-R quimérico comprende:
- (a) SEQ ID N.º: 12;
- (b) un fragmento de SEQ ID N.º: 12 que se une a BAFF;
- 40 (c) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 80% a SEQ ID N.º: 12 o un fragmento de SEQ ID N.º: 12; o

- (d) SEQ ID N.º:12 o un fragmento de SEQ ID N.º: 12, modificado por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en el que la secuencia modificada se une a BAFF.
- 10.- El polipéptido BAFF-R quimérico de la reivindicación 9, en el que el polipéptido BAFF-R quimérico comprende los aminoácidos 23 - 92 de SEQ ID N.º: 12 y la región Fc de IgG1 humana.
- 5 11.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 10, en el que el polipéptido BAFF-R quimérico comprende:
- (a) la región Fc de un anticuerpo;
  - (b) secuencias derivadas de una proteína de inmunoglobulina;
  - (c) una secuencia señal heteróloga; o
  - (d) glutatión S-transferasa.
- 10 12.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 10, en el que el polipéptido BAFF-R quimérico comprende una región constante de inmunoglobulina y un polipéptido BAFF-R seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 (a) una cualquiera de SEQ ID N.º: 13, SEQ ID N.º: 14; SEQ ID N.º: 15; SEQ ID N.º: 16; SEQ ID N.º: 17; SEQ ID N.º: 18; SEQ ID N.º: 19; SEQ ID N.º: 20; SEQ ID N.º: 21; SEQ ID N.º: 22; SEQ ID N.º: 23; SEQ ID N.º: 24; SEQ ID N.º: 25; SEQ ID N.º: 26; SEQ ID N.º: 27; SEQ ID N.º: 28; SEQ ID N.º: 29; SEQ ID N.º: 30; SEQ ID N.º: 31; y SEQ ID N.º: 32; y
- (b) un fragmento de (a) que se une a BAFF.
- 13.- Un polipéptido BAFF-R para usar en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R, en el que el polipéptido BAFF-R comprende:
- (a) SEQ ID N.º: 9;
  - 20 (b) un fragmento de SEQ ID N.º: 9 que se une a BAFF;
  - (c) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 70% a SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de SEQ ID N.º: 9;
  - (d) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 80% a SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de SEQ ID N.º: 9;
  - 25 (e) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 90% a SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de SEQ ID N.º: 9; o
  - (f) SEQ ID N.º: 9 o un fragmento de SEQ ID N.º: 9, modificado por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en el que la secuencia modificada se une a BAFF.
- 14.- El polipéptido BAFF-R de la reivindicación 13, en el que el polipéptido BAFF-R comprende:
- 30 (a) SEQ ID N.º: 14;
  - (b) un fragmento de SEQ ID N.º: 14 que se une a BAFF;
  - (c) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 70% a SEQ ID N.º: 14 o un fragmento de SEQ ID N.º: 14;
  - (d) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 80% a SEQ ID N.º: 14 o un fragmento de SEQ ID N.º: 14;
  - 35 (e) una secuencia de aminoácidos que se une a BAFF y es idéntica en al menos un 90% a SEQ ID N.º: 14 o un fragmento de SEQ ID N.º: 14; o
  - (f) SEQ ID N.º: 14 o un fragmento de SEQ ID N.º: 14, modificado por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, en el que la secuencia modificada se une a BAFF.
- 40 15.- Un anticuerpo o un polipéptido que comprende una parte de unión a antígeno de un anticuerpo, para su uso en el tratamiento de células B tumorigénicas que expresan BAFF y/o BAFF-R, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno de un polipéptido se une específicamente al polipéptido BAFF-R que tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID N.º: 9 o SEQ ID N.º: 10.
- 45 16.- El anticuerpo o polipéptido de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno de un polipéptido es uno o más de los siguientes:

- (a) monoclonal;
  - (b) policlonal;
  - (c) quimérico;
  - (d) humanizado;
- 5 (e) un anticuerpo de cadena sencilla;
- (f) un fragmento Fab; y
  - (g) un fragmento F(ab)'2.
- 17.- El anticuerpo o polipéptido de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno de un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido según la reivindicación 1(a)-(g) o la reivindicación 2.
- 10 18.- El anticuerpo o polipéptido de la reivindicación 15 , en el que el anticuerpo es producido por:
- (a) clon de hibridoma nº 2.1, depositado como ATCC nº PTA-3689; o
  - (b) clon de hibridoma nº 9.1, depositado como ATCC nº PTA-3688.
- 19.- El anticuerpo o polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 , en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno de un anticuerpo bloquea la unión de BAFF a BAFF-R.
- 15 20.- El anticuerpo o polipéptido de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno de un anticuerpo está humanizado.

**Figura 1A**  
**Secuencia del clon de ADNc JST576**

1 GCACCATGAG GCGAGGGCCC CGGAGCCTGC GGGGCAGGGA CGCGCCAGCC  
51 CCCACGCCCT GCGTCCCGGC CGAGTGCTTC GACCTGCTGG TCCGCCACTG  
101 CGTGGCCTGC GGGCTCCTGC GCACGCCGCG GCCGAAACCG GGTAAGGGGG  
151 ACCCACGGGG CGCGCGGCGC CGGCAGCTGC GGGGAGAACG GGGCCCCGAT  
201 CGCCAGGGCG CAGGCAGAGC CCCGACCCCC GGGGGCGCCG AGGGCTGAAA  
251 GGACCCTGTG GGCAGGGCCT GGAGGGGCCC GCGATCACCG CGTGGCCCTC  
301 ACCGCCGCTT CTCTCCCTCC CCTTGTCCAC CGCCCCCGG CTGTCCCTCC  
351 CCTCCCCGGC CAGCCTCGCC CCCCTCCGCC CCTCCCCGTC CCCGCTCCTC  
401 CCTCCCCCTG GCCCCCTGGC CTCCCTCCCT GTCCCTCCC GAAGCAGCCG  
451 GGGCCAGCAG CCCTGCGCCC AGGACGGCGC TGCAGCCGCA GGAGTCGGTG  
501 GGC GCGGGG CCGGCGAGGC GGCGCTGCC CTGCCCGGGC TGCTCTTTGG  
551 CGCCCCCGC CTGCTGGGCC TGGCACTGGT CCTGGCGCTG GTCCTGGTGG  
601 GTCTGGTGAG CTGGAGGCGG CGACAGCGGC GGCTTCGCGG CGCGTCCTCC  
651 GCAGAGGCC CCGACGGAGA CAAGGACGCC CCAGAGCCCC TGGACAAGGT  
701 CATCATCTG TCTCCGGAA TCTCTGATG CACAGCTCCT GCCTGGCCTC  
751 CTCCTGGGGA AGACCCAGGA ACCACCCAC CTGGCCACAG TGTCCCTGTG  
801 CCAGCCACAG AGCTGGGCTC CACTGAACTG GTGACCACCA AGACGGCCGG  
851 CCCTGAGCAA CAATAGCAGG GAGCCGGCAG GAGGTGGCCC CTGCCCTCCC  
901 TCTGGACCCC CAGCCAGGGG CTTGGAAATC AAATTCAGCT CTTCACTCCA  
951 GCATGCACAT GCCCTCTTTC TGGGACCAGG CTAACCCTGC AGAAGCACAG  
1001 ACACTACAGA CCACAGCATT CAGCCCCAT GGAGTTTGGT GTGCTTGCTC  
1051 TTGGCTTCAG ACCTCACCAT CTTTGACAGC CCTTGAAGGT GGTAGCCCAG  
1101 CTCTGTTC TGTGCCTTCA AAAGGCTGGG GCACTATGAG TAAAAGACCG  
1151 CTTTAAAAAT GGGGAAGGCA CCATTAAGCC AAAATGAATC TGAAAAAGA  
1201 C

**Figura 1B**  
**Secuencia de EST AI250289**

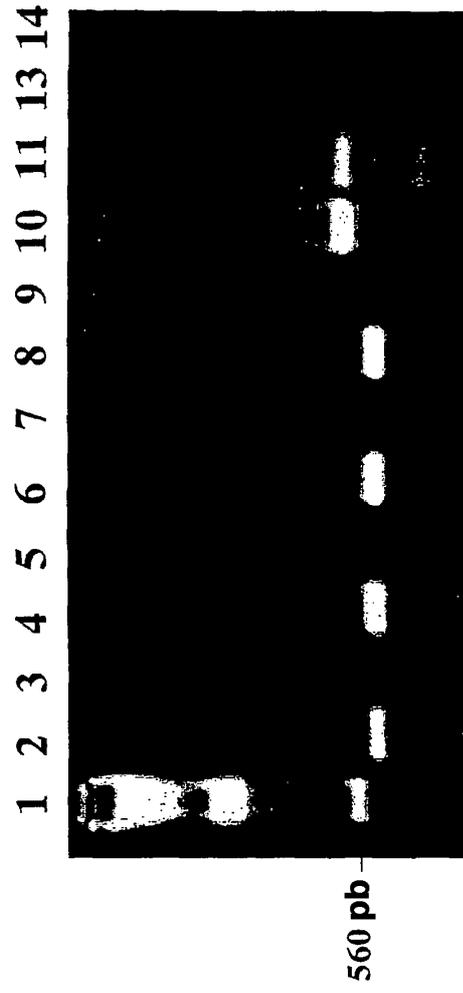
1 GTCGACCCAC GCGTCCGCCC ACGCGTCCGG TGCGGCGGCG TCGGCACCAT  
51 GAGGCGAGGG CCCC GGAGCC TCGGGGGCAG GGACGCGCCA GCCCCACGC  
101 CCTGCGTCCC GGCCGAGTGC TTCGACCTGC TGGTCCGCCA CTGCGTGGCC  
151 TCGGGGCTCC TCGCACGCC GCGGCCGAAA CCGGGTAAGG GGGACCCACG  
201 GGGCGCGCGG CGCCGGCAGC TCGGGGAGA ACGGGGCCCC GATCGCCAGG  
251 GCGCAGGCAG AGCCCCGACC CCCGGGGGCG CCGAGGGCTG AAAGGACCTT  
301 GTGGGCAGGG CCTGGAGGGG CCCGCGATCA CCGCGTGGCC CTCACCGCCG  
351 CCTCTCTCCC TCCCCTTGTC CACCGCCCCC CGGCTGTCCC TCCCCTCCCC  
401 GGCCAGCCTC GCCCCCCTCC GCCCCTCCCC GTCCCCGCTC CTCCCTCCCC  
451 TCGGCCCCCT GGCCTCCCTC CCTGTCCCCT CCCGAAGCAG CCGGGGCCAG  
501 CAGCCCTGCG CCCAGGACGG CGCTGCAGCC GCAGGAGTCG GTGGGCGCGG  
551 GGGCCGGCGA GCGGGCGCTG CCCCTGCCCC GGCTGCTCTT TGGCGCCCCC  
601 GCGCTGCTGG GCCTGGCACT GGTCTTGGCG CTGGTCCTGG TGGGTCTGGT  
651 GAGCTGGAGG CGGCGACAGC GCGGGCTTCG CGGCGCGTCC TCCGCAGAGG  
701 CCCCCGACGG AGACAAGGAC GCCCCAGAGC CCCTGGACAA GGTCATCATT  
751 CTGTCTCCGG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CCTGCCTGGC CTCCTCTGG  
801 GGAAGACCCA GGAACCACCC CACCTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCCAGCCA  
851 CAGAGCTGGG CTCCACTGAA CTGGTGACCA CCAAGACGGC CGGCCCTGAG  
901 CAACAATAGC AGGGAGCCGG CAGGAGGTGG CCCCTGCCCT CCCTCTGGAC  
951 CCCAGCCAG GGGCTTGAA ATCAAATTCA GCTCTTCACT CC

**Figura 2A**  
**Secuencia de JST576 prevista por GENSCAN**

```

1      GGCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51     CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101    CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151    AGCCGGGGCC AGCAGCCCTG CGCCAGGAC GGCCTGCAG CCGCAGGAGT
201    CGGTGGGCGC GGGGGCCGCG GAGGCGGCGC TGCCCTGCC CGGGCTGCTC
251    TTTGGCGCCC CCGCGTGCT GGGCCTGGCA CTGGTCCTGG CGCTGGTCCT
301    GGTGGGTCTG GTGAGCTGGA GCGGCGGACA GCGGCGGCTT CGCGGCGCGT
351    CCTCCGAGA GGCCCCGAC GGAGACAAGG ACGCCCAGA GCCCTGGAC
401    AAGGTCATCA TTCTGTCTCC GGAATCTCT GATGCCACAG CTCCTGCCCTG
451    GCCTCCTCCT GGGGAAGACC CAGGAACCAC CCCACCTGGC CACAGTGTCC
501    CTGTGCCAGC CACAGAGCTG GGCTCCACTG AACTGGTGAC CACCAAGACG
551    GCCGGCCCTG AGCAACAATA GCAGGGAGCC GGCAGGAGGT GGCCCTGCC
601    CTCCTCTGG ACCCCAGCC AGGGGCTTGG AAATCAAATT CAGCTCTTCA
651    CTCCAGCATG CACATGCCCT CTTCCTGGGA CCAGGCTAAC CCTGCAGAAG
701    CACAGACACT ACAGACCACA GCATTCAGCC CCCATGGAGT TTGGTGTGCT
751    TGCCTTTGGC TTCAGACCTC ACCATCTTTG ACAGCCCTTG AAGGTGGTAG
801    CCCAGCTCCT GTTCCTGTGC CTTCAAAGG CTGGGGCACT ATGAGTAAAA
851    GACCGCTTTT AAAATGGGA AGGCACCATT AAGCCAAAT GAATCTGAAA
901    AAAGAC
    
```

**Figura 2B**



**Figura 2C**  
**Secuencia de JST576 sin el intrón**

```

1      GCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51     CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101    CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151    CGGGGCCAGC AGCCCTGCGC CCAGGACGGC GCTGCAGCCG CAGGAGTCGG
201    TGGGCGCGGG GGCCGGCGAG GCGGCGCTGC CCCTGCCCGG GCTGCTCTTT
251    GCGCCCCCGG CGCTGTGGG CCTGGCACTG GTCCTGGCGC TGGTCCTGGT
301    GGGTCTGGTG AGCTGGAGGC GCGGACAGCG GCGGCTTCGC GCGCGTCCCT
351    CCGCAGAGGC CCCCAGCGGA GACAAGGACG CCCCAGAGCC CCTGGACAAG
401    GTCATCATTC TGTCTCCGGG AATCTCTGAT GCCACAGCTC CTGCCTGGCC
451    TCCTCCTGGG GAAGACCCAG GAACCACCCC ACCTGGCCAC AGTGTCCCTG
501    TGCCAGCCAC AGAGCTGGGC TCCACTGAAC TGGTGACCAC CAAGACGGCC
551    GGCCCTGAGC AACAATAGCA GGGAGCCGGC AGGAGGTGGC CCCTGCCCTC
601    CCTCTGGACC CCCAGCCAGG GGCTTGAAA TCAAATCAG CTCTTCACTC
651    CAGCATGCAC ATGCCCTCTT TCTGGGACCA GGCTAACCTT GCAGAAGCAC
701    AGACACTACA GACCACAGCA TTCAGCCCCC ATGGAGTTTG GTGTGCTTGC
751    CTTTGGCTTC AGACCTCACC ATCTTTGACA GCCCTTGAAG GTGGTAGCCC
801    AGCTCCTGTT CCTGTGCCTT CAAAAGGCTG GGGCACTATG AGTAAAAGAC
851    CGCTTTTAAA ATGGGAAGG CACCATTAAG CAAAATGAA TCTGAAAAAA
901    GAC

```

**Figura 2D**  
**Secuencia de aminoácidos de BAFF-R humano**

M R R G P R S L R G R D A P A P T P  
 C V P A E C F D L L V R H C V A C G  
 L L R T P R P K P A A G A S S P A P  
 R T A L Q P Q E S V G A G A G E A A  
 L P L P G L L F G A P A L L G L A L  
 V L A L V L V G L V S W R R R Q R R  
 L R G A S S A E A P D G D K D A P E  
 P L D K V I I L S P G I S D A T A P  
 A W P P P G E D P G T T P P G H S V  
 P V P A T E L G S T E L V T T K T A  
 G P E Q Q •

**Figura 3**

GGCGCCTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATGTTTG AACCCGGGAG  
 \* T R E

GCAGAGCTTG CAGTGAGCCG AGATAGCGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCG ACAGAGCGAG  
 A E L A V S R D S A I A L Q P G R Q S E

ACTCCGTCTC AAAAAAAAAA AAAGAAAAGA AAGGGGGGCC CCAGGCGAGC TCGGTCCCAC  
 T P S Q K K K K K R K G G P R R A R S H

CCAGCAGGCG GGGGCGGGC AGGGCAGAGT GCTCCCCCG CCCCCGCTT CCTCCCCGAG  
 P A G G G G A G Q S A P P A P R F L P E

GGCCCCGAG CCCAGCTCAG CCTCAGTCCC CGCAGCTTGT GCGGCGGCGT CGGCACCATG  
 G P G A Q L S L S P R S L C G G V G T M

AGGCGAGGGC CCCGGAGCCT GCGGGGCAGG GACGCGCCAG CCCCCAGCC CTGCGTCCCG  
 R R G P R S L R G R D A P A P T P C V P

GCCGAGTGCT TCGACCTGCT GGTCCGCCAC TCGTGGCCT GCGGGCTCCT GCGCACGCCG  
 A E C F D L L V R H C V A C G L L R T P

CGGCCGAAAC CGGCCGGGC CAGCAGCCCT GCGCCAGGA CCGCGCTGCA GCCGCAGGAG  
 R P K P A G A S S P A P R T A L Q P Q E

TCGGTGGGCG CGGGGGCCGG CGAGGCGGCG CTGCCCCTGC CCGGGCTGCT CTTTGGCGCC  
 S V G A G A G E A A L P L P G L L F G A

CCCGCGTGC TGGCCTGGC ACTGGTCTTG GCGTGGTCC TGGTGGTCT GGTGAGCTGG  
 P A L L G L A L V L A L V L V G L V S W

AGGCGGCGAC AGCGGCGGCT TCGCGGCGG TCCTCCGAG AGGCCCCGA CGGAGACAAG  
 R R R Q R R L R G A S S A E A P D G D K

GACGCCCCAG AGCCCTGGA CAAGGTCATC ATTCTGTCTC CGGAATCTC TGATGCCACA  
 D A P E P L D K V I I L S P G I S D A T

GCTCCTGCCT GGCCTCCTCC TGGGGAAGAC CCAGGAACCA CCCCACCTGG CCACAGTGTC  
 A P A W P P P G E D P G T T P P G H S V

CCTGTGCCAG CCACAGAGCT GGGCTCCACT GAACTGGTGA CCACCAAGAC GGCCGGCCCT  
 P V P A T E L G S T E L V T T K T A G P

GAGCAACAAT AGCAGGGAGC CGGCAGGAGG TGGCCCCTGC CCTCCCTCTG GACCCCGAG  
 E Q Q \*

CAGGGGCTTG GAAATCAAAT TCAGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCC TCTTTCTGGG  
 ACCAGGCTAA CCCTGCAGAA GCACAGACAC TACAGACCAC AGCATTGAG CCCCATGGAG  
 TTTGGTGTG TTGCCTTTGG CTTTCAGACCT CACCATCTTT GACAGCCCTT GAAGGTGGTA  
 GCCCAGCTCC TGTTCCTGTG CTTTCAAAG GCTGGGGCAC TATGAGTAAA AGACCGCTTT  
 TAAAATGGGG AAGGCACCAT TAAGCCAAAA TGAATCTGAA AAAAGAC

**Figura 4A**  
**Secuencia de BAFF-R murino**

```

1      GAATTCGGCA CGAGCCCAGA CTCGGAAGCTG TCCCAGCTGC ATGAGGGGGC
51     GACATGGGCG CCAGGAGACT CCGGGTCCGA AGCCAGAGGA GCCGGGACAG
101    CTCGGTGCCC ACCCAGTGCA ATCAGACCGA GTGCTTCGAC CCTCTGGTGA
151    GAAACTGCGT GTCCTGTGAG CTCCTCCACA CGCCGGACAC TGGACATACA
201    AGCAGCCTGG AGCCTGGGAC AGCTCTGCAG CCTCAGGAGG GCTCCGCGCT
251    GAGACCCGAC GTGGCGCTGC TCGTCGGTGC CCCCCTACTC CTGGGACTGA
301    TACTGGCGCT GACCCTGGTG GGTCTAGTGA GTCTGGTGAG CTGGAGGTGG
351    CGTCAACAGC TCAGGACGGC CTCCCAGAC ACTTCAGAAG GAGTCCAGCA
401    AGAGTCCCTG GAAAATGTCT TTGTACCCTC CTCAGAAACC CCTCATGCCT
451    CAGCTCCTAC CTGGCCTCCG CTCAAAAGAAG ATGCAGACAG CGCCCTGCCA
501    CGCCACAGCG TCCCGGTGCC CGCCACAGAA CTGGGCTCCA CCGAGCTGGT
551    GACCACCAAG ACAGCTGGCC CAGAGCAATA GCAGCAGTGG AGGCTGGAAC
601    CCAGGGATCT CTACTGGGCT TGTGGACTTC ACCCAACAGC TTGGGAAAGA
651    ACTTGGCCCT TCAGTGACGG AGTCCTTTGC CTGGGGGGCG AACCCGGCAG
701    AACCAGACAC TACAGGCCAC ATGAGATTGC TTTTGTGTTA GCTCTTGACT
751    TGAGAACGTT CCATTTCTGA GATGGTTTTT AAGCCTGTGT GCCTTCAGAT
801    GGTGGATAG ACTTGAGGGT TGCATATTTA ATCTCTGTAG TGAGTCCGGAG
851    ACTGGAAACT TAATCTCGTT CTAAAATTTT TGGATTACTG GGTGGAGGT
901    ATGGCTCAGC AGTTCGGTTT GTGTGCTGTT CTAGCCGAGG ACTCCAGTTG
951    TTCAGCTTCC CGGAAGCTCAG ATCTGGCAGC TTAAGACCAC CTGTCACTCC
1001   AGCCCCTGGA ACATCCTTGC CTCCAAGGC ACCAGCACTC ATTTGCTCTA
1051   GAGCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAT
1101   ATGCATGCAT GCACACTTAA AAATGTCAAA ATTAGCGGCT GGAGAAATTC
1151   ATGGTCAACA GCGCTTACTG TGATTCCAGA GGATGAGAGT TTGATTCCCA
1201   GAATGCACTG CCGGTGGGCTC ATTACTGAGC ATAACFTTTG CTTCAGGGGA
1251   CCTGATGCCT CTGGACTTCA TGGGCATCTG TATTCACGTG CACATCCTAC
1301   ACACACACAC ACACACACAC ACAGACATAC ACACACACAC ACTCTTTTAC
1351   AAATGATAAA ATATAAGATA GGCATGGTGG TACACACCTT TAATCCCAAC
1401   ATTGGGGAAG CAAAGGCAGG CAGGTAAGT AGTTGGAGGC CATCCTGGTC
1451   TACATAGCAA GTTCCAGGCT AACCAGAGCT AAATGGTGAG ACCAAGTCTC
1501   AAAATAATAC TCCCCCCCCA AAAAAAAAAA ACTTTTAAAT TTTGATTTTT
1551   TTCTTTTATT ATTATTTTTT ATATTAATTT CATGGTGTTT AGAAGTGGTA
1601   TACTTAGATG GTGACTAAGA GGAGGTAAAG CCATCAGGAC TGAGCCCCTA
1651   ACATACAAGG AGAAAGCAGA GACAATGAAC ACGCCCCCTC CCTGCTGTGT
1701   GCCAGCTCTG GACCACCAGC CAGAGGGCAA TCATCAGATG TGGGCCCTAG
1751   AACCTTCAGA GCCGAAAGCT AAATCAATCT CATTTCTTTG TAAAGCTATT
1801   TAGCCTTAGG TGTTTTGTTA CGGTGATATA AAATGGACTA ACACAGGCAC
1851   TATGAGTAAG AAGCTTTTCT TTGAGCTGGG AAAGGTACTG TTAAACCAAA
1901   ATTAATCTGA ATAAAAAAG GCTAAGGGGA AGACACTTAA AAA

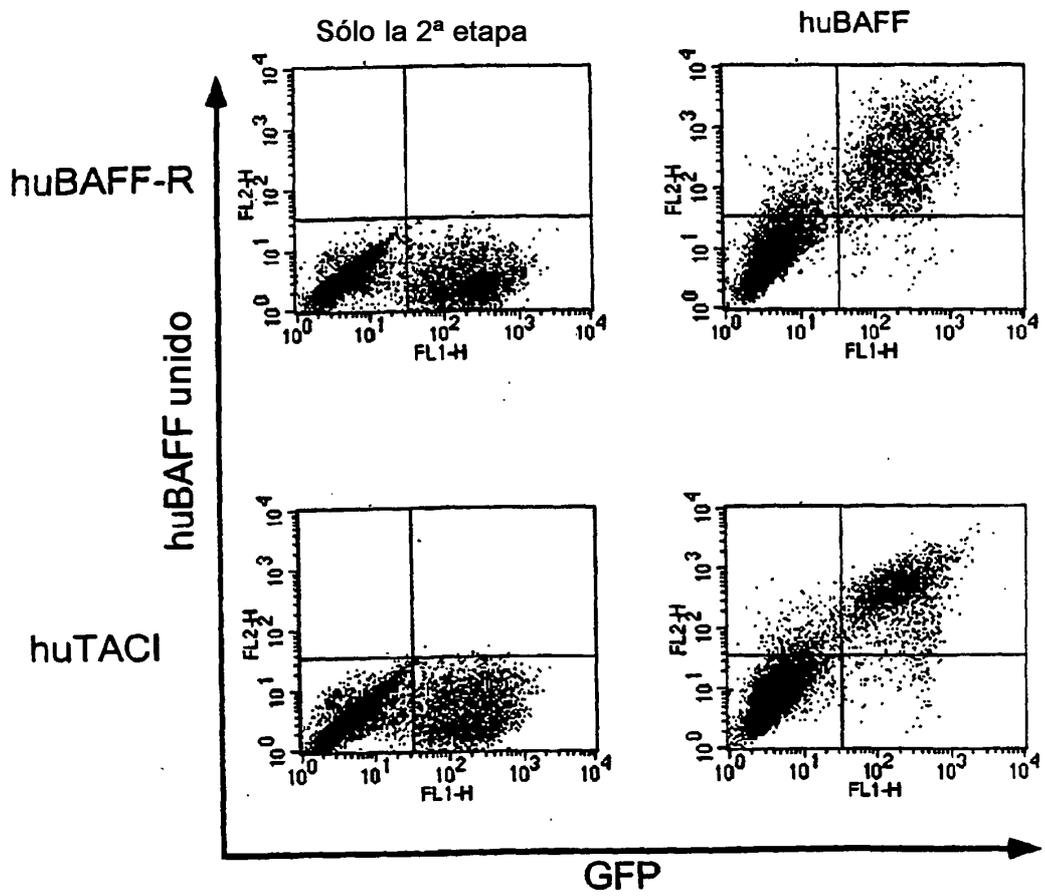
```

**Figura 4B**  
**Secuencia de aminoácidos de BAFF-R murino**

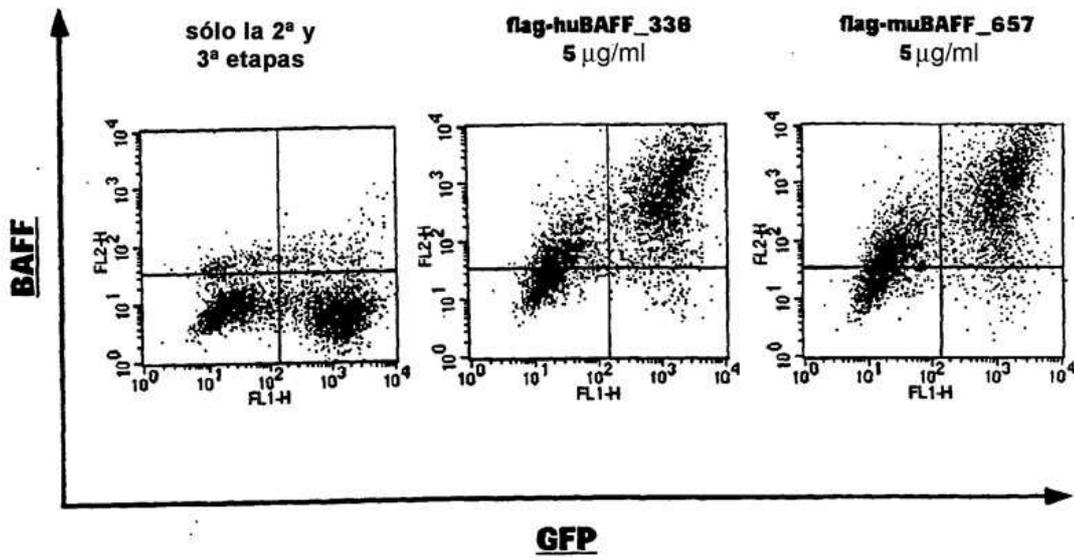
MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCEL  
FHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG  
LILALTLVG LVSLVSWRWRQQLRTASPDTSEGVQQESLEN  
VFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS  
TELVTTKTAGPEQ



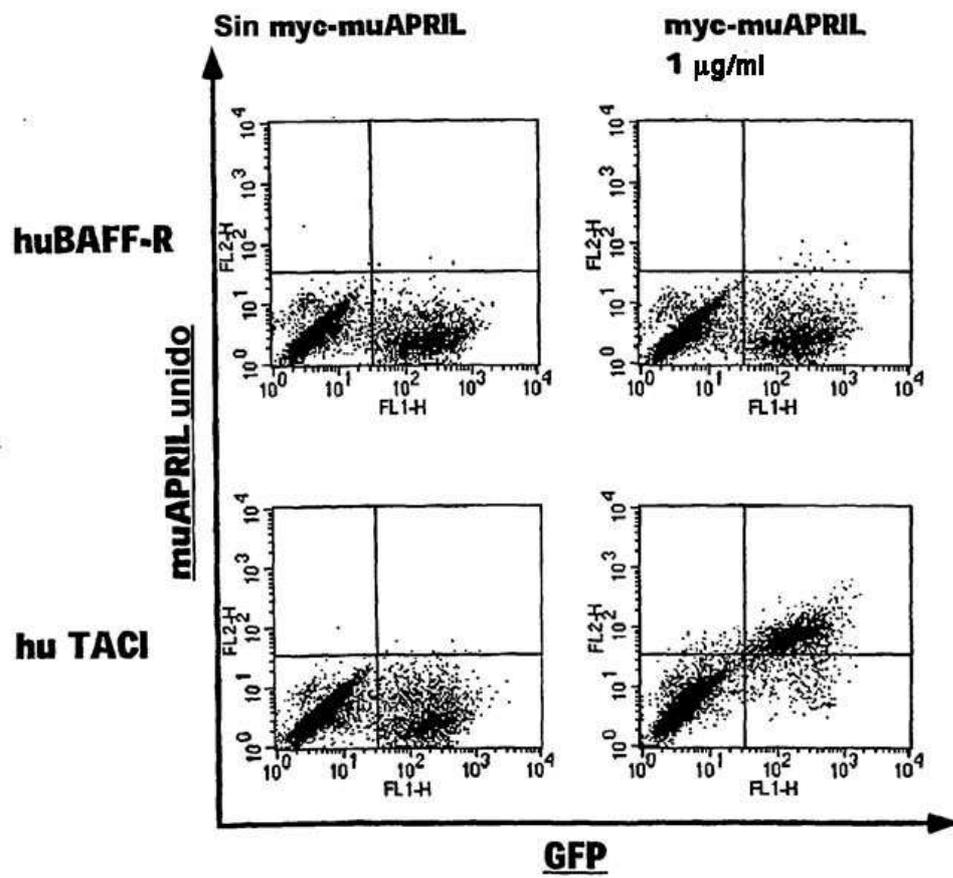
**Figura 5:**



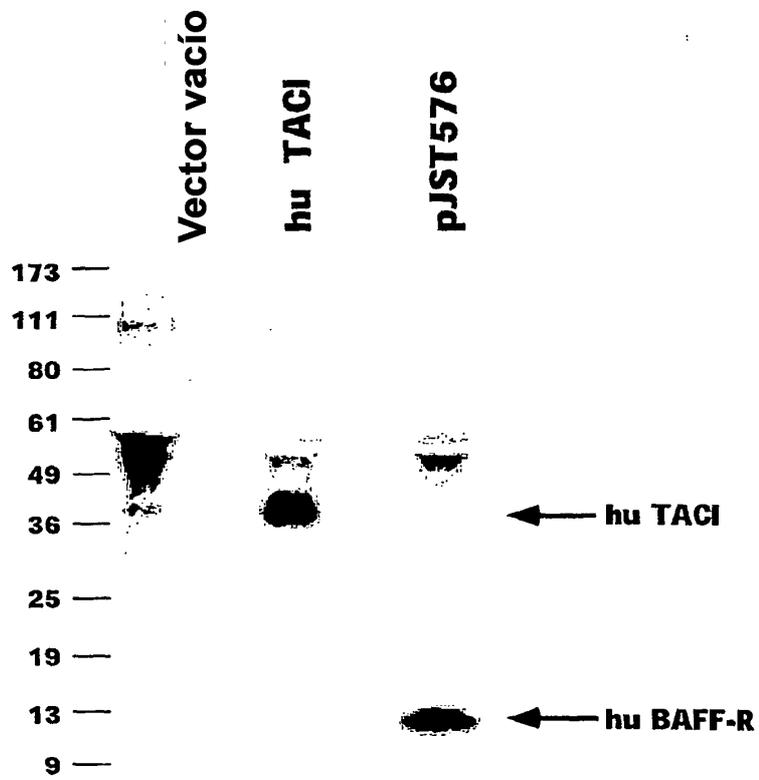
**Figura 6:**



**Figura 7:**



**Figura 8:**



**Figura 9**

1 ATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCACCTGGT  
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

61 GACGTCAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGCAGGGACGCGCCAGCCCCACGCCCTGC  
D V R R G P R S L R G R D A P A P T P C

121 GTCCCCGCCGAGTGCTTCGACCTGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGC  
V P A E C F D L L V R H C V A C G L L R

181 ACGCCGCGCCGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCAGGACGGCGCTGCAGCCG  
T P R P K P A G A S S P A P R T A L Q P

241 CAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGGCCGGCGAGGCGCGGTGACAAAACCTCACACATGCCCA  
Q E S V G A G A G E A A V D K T H T C P

301 CCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC  
P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P

361 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC  
K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S

421 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A

481 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACC  
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T

541 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC  
V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A

601 CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q

661 GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC  
V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C

721 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG  
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P

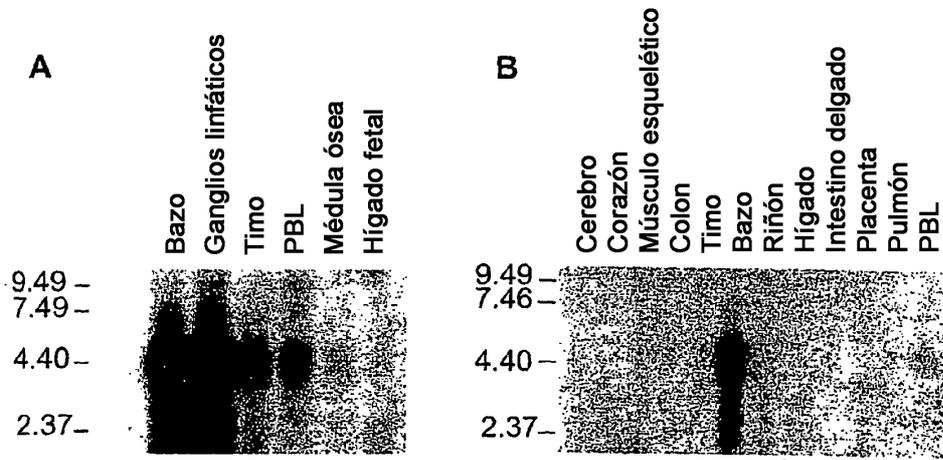
781 GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTAC  
E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y

841 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG  
S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V

901 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA  
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

961 TGA  
•

Figura 10:



**Figura 10C**

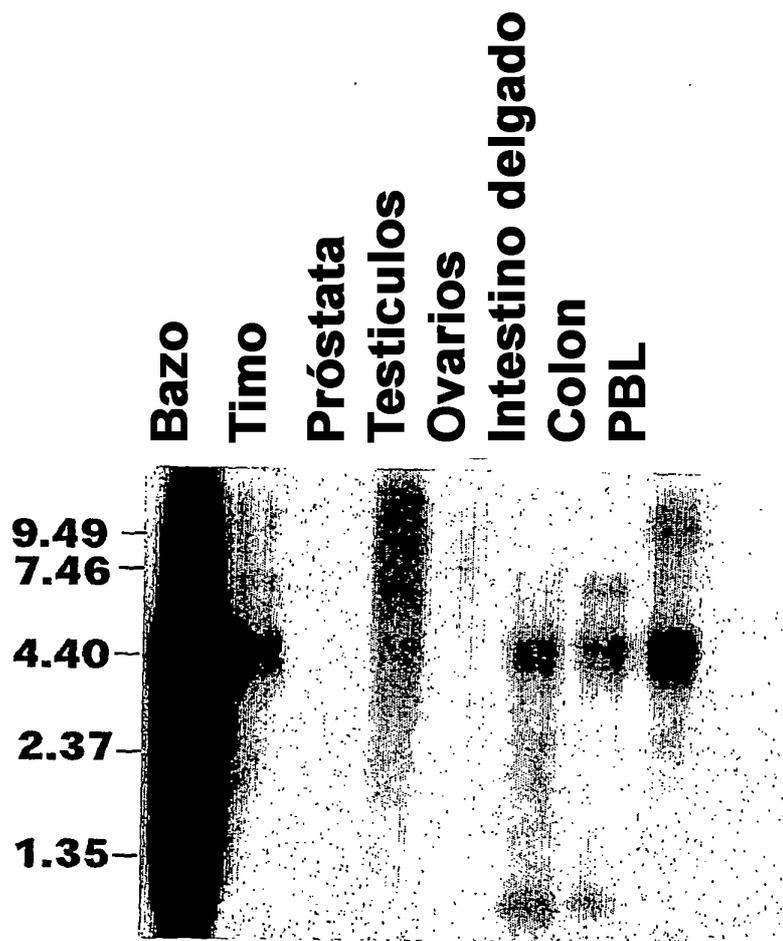
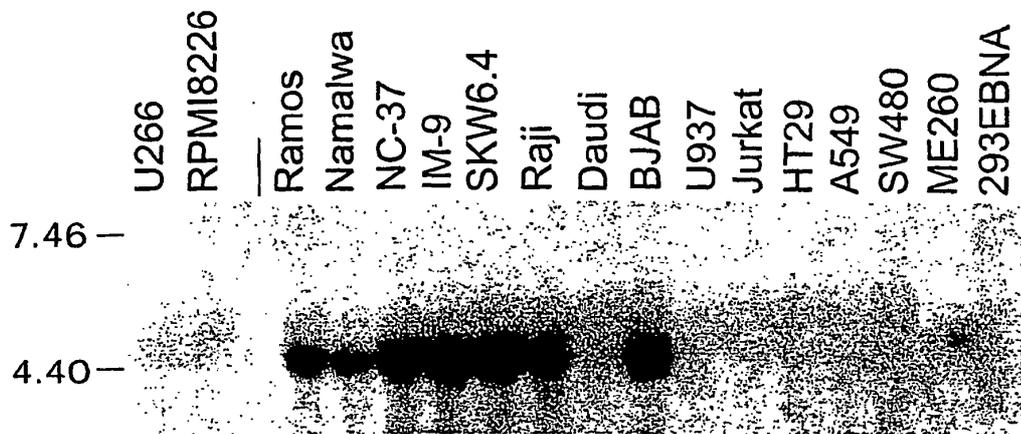
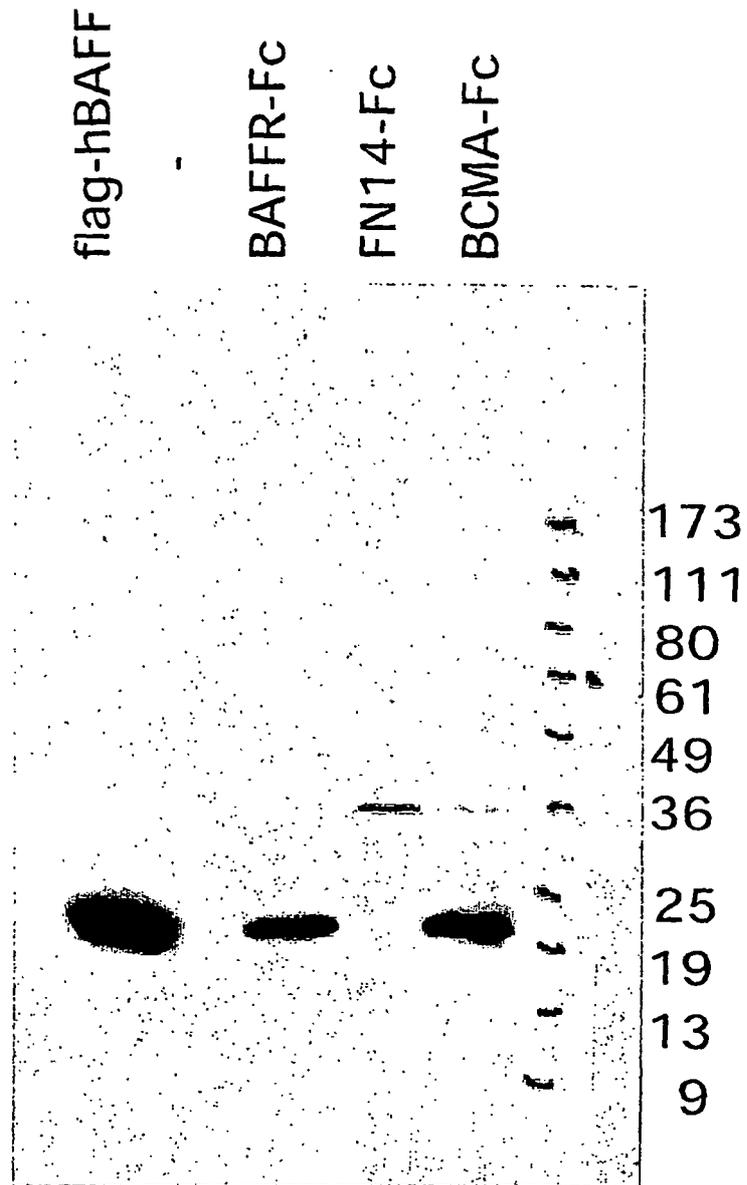


Figura 11:



**Figura 12**



**Figura 13:**

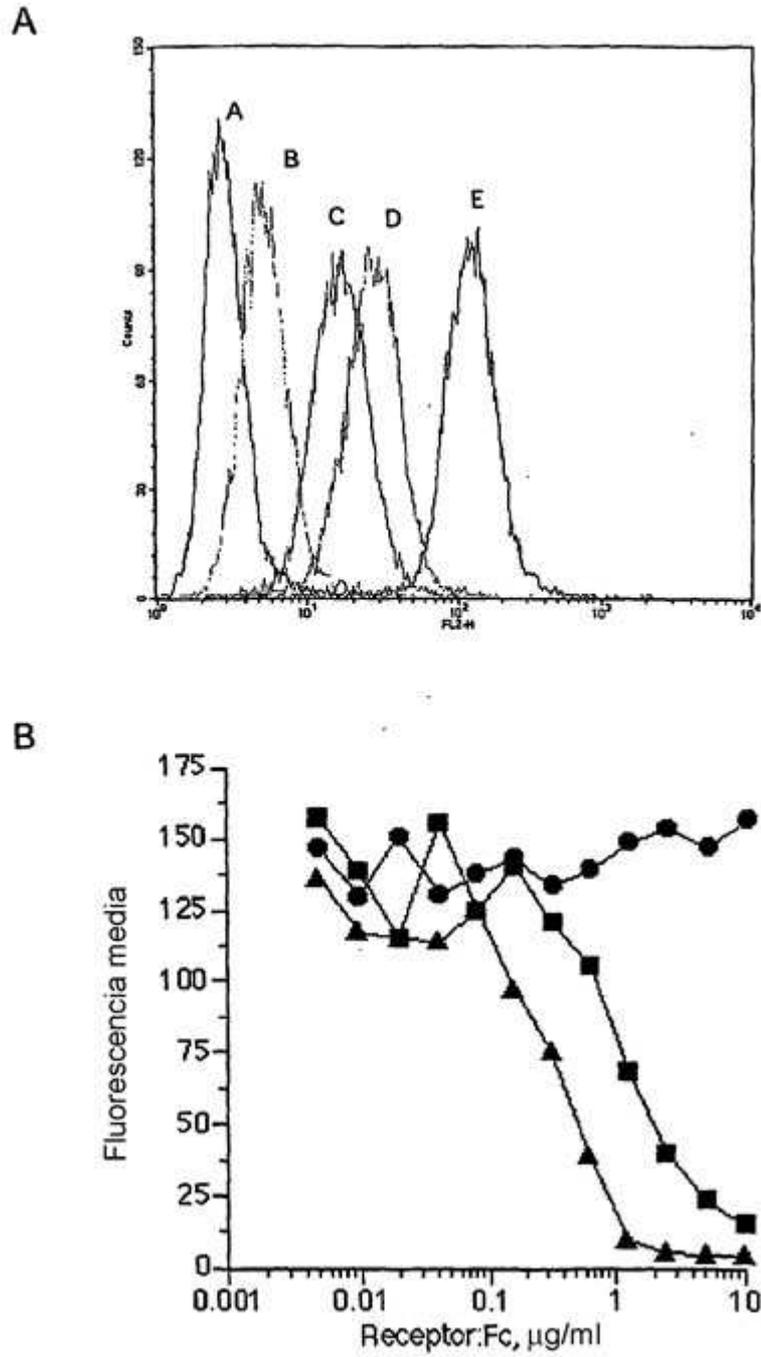
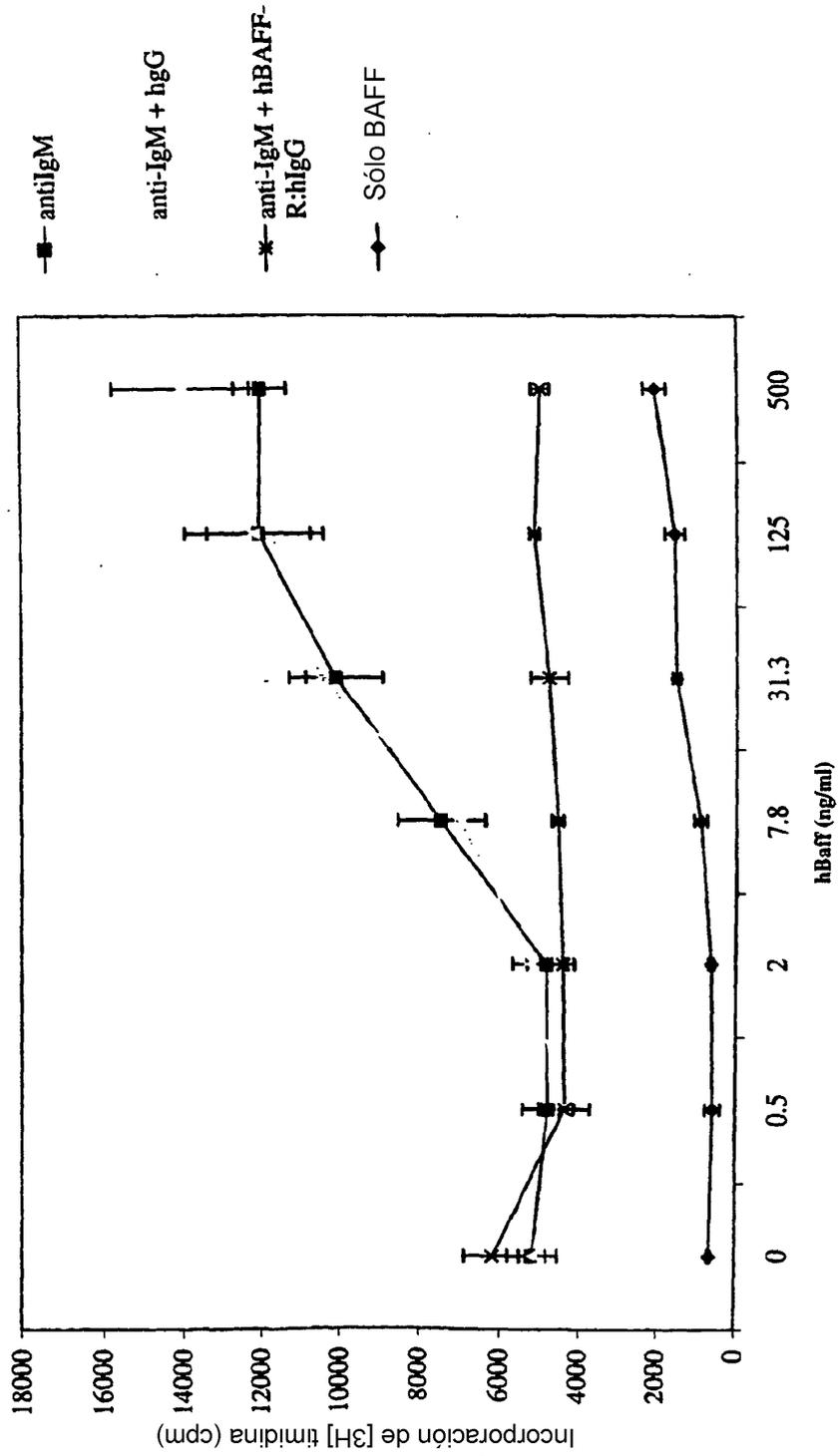
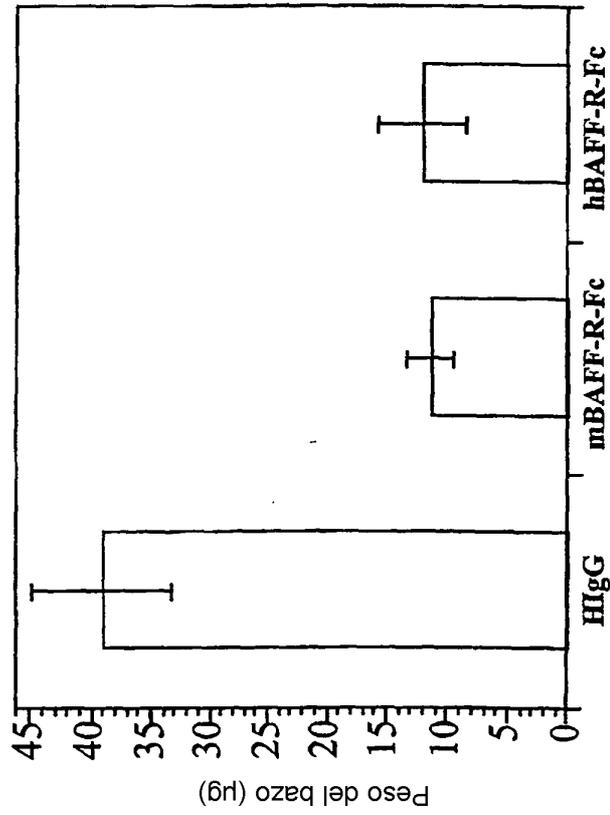


Figura 14



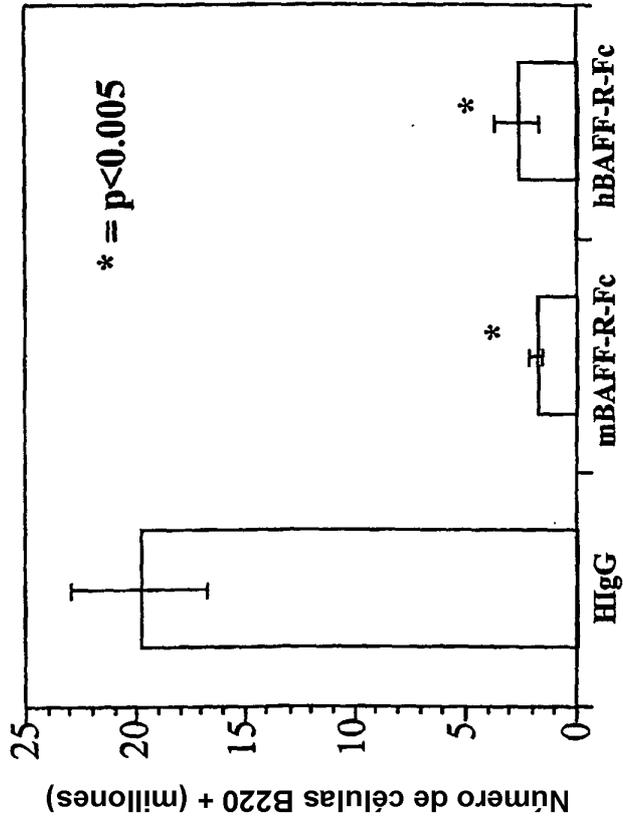
**Figura 15**  
**El tratamiento con BAFF-R-Fc da como resultado la reducción del peso del bazo**



Los ratones recibieron 200 µg de HlgG, mBAFF-R-Fc o hBAFF-R-Fc los días 1,4,8,11,15,18,22 y 25. Se sacrificaron los ratones el día 28, se extirparon los bazos y se registraron los pesos

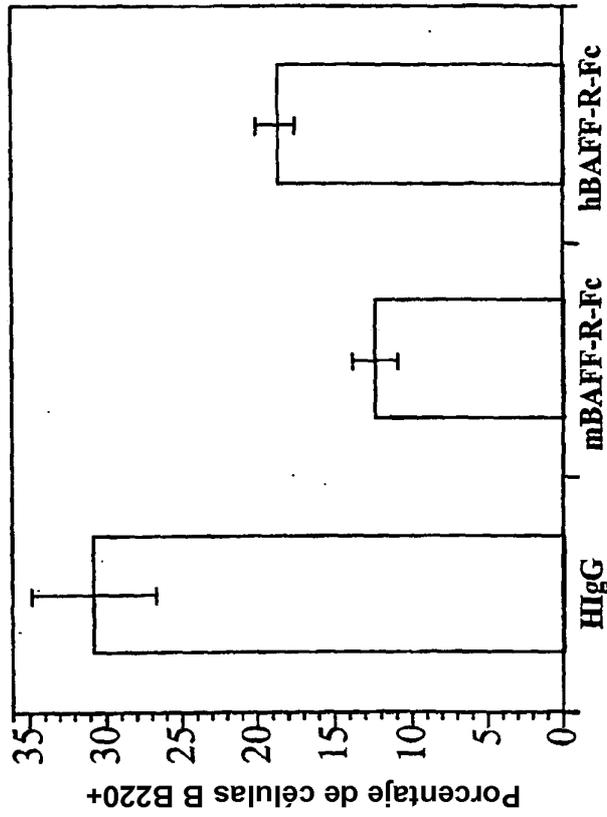
Figura 16

El tratamiento con BAFF-R-Fc humano y de ratón reduce el número de células B B220 + esplénicas



Los ratones recibieron 200 µg de HIgG, mBAFF-R-Fc o hBAFF-R-Fc los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, y 25. Se sacrificaron los ratones el día 28 se extirparon los bazoos para el análisis del número de células B.

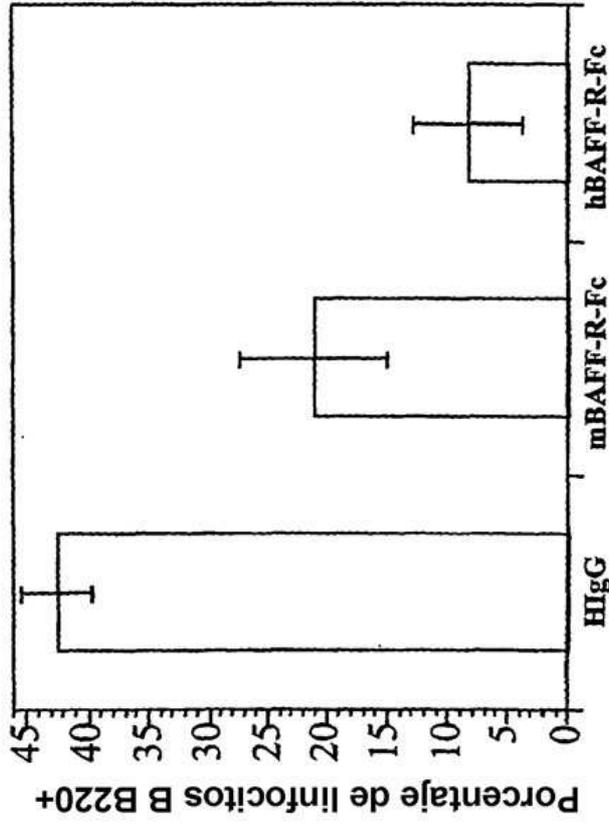
**Figura 17**  
**El tratamiento con BAFF-R-Fc reduce el porcentaje de células B B220+ en los ganglios linfáticos**



Los ratones recibieron 200 µg de HIgG, mBAFF-R-Fc o hBAFF-R-Fc los días 1,4,8,11,15,18,22 y 25. Se sacrificaron los ratones el día 28, se extirparon los GL y se analizaron para detectar células B B220+.

Figura 18

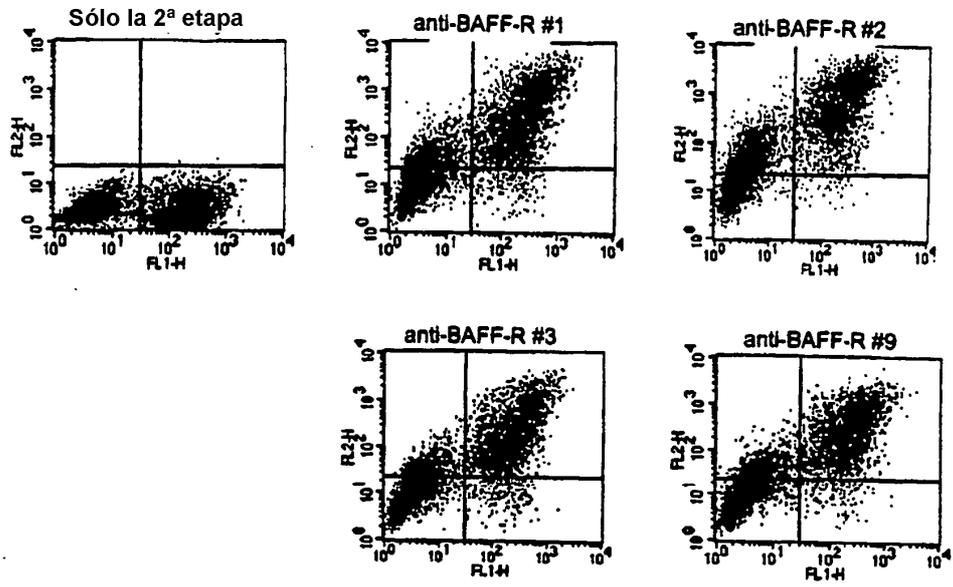
El tratamiento con BAFF-R-Fc da como resultado la reducción de linfocitos B B220+ de sangre periférica



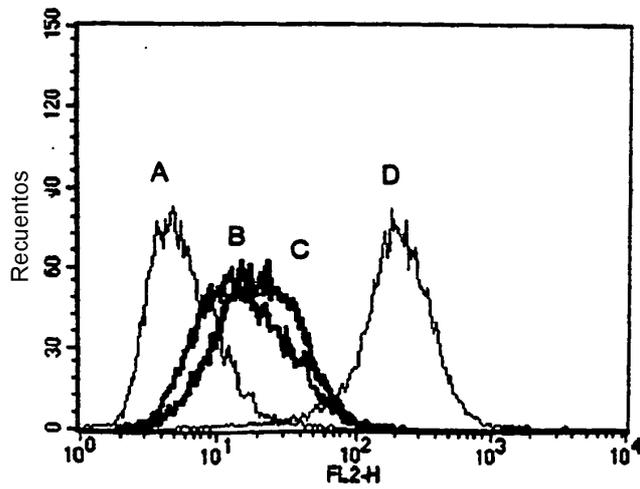
Los ratones recibieron 200 µg de HlgG, mBAFF-R-Fc o hBAFF-R-Fc los días 1,4,8,11,15,18,22 y 25. Se extrajo sangre periférica antes del sacrificio el día 28, y se determinó el porcentaje de linfocitos B220+.

Figura 19

**A**



**B**





**Figura 21**

