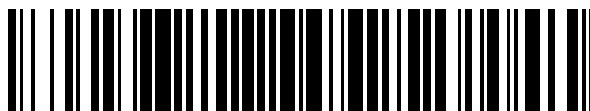


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 834**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02756428 .5**
96 Fecha de presentación: **15.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1432735**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-HTNFSF13B antagonistas**

30 Prioridad:
16.08.2001 US 312808 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US

72 Inventor/es:
GELFANOVA, VALENTINA, PAVLOVNA;
HALE, JOHN, EDWARD;
KIKLY, KRISTINE, KAY;
WITCHER, DERRICK, RYAN y
RATHNACHALAM, RADHAKRISHNAN

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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).

ES 2 389 834 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos anti-TNFSF13B antagonistas.

Los ligandos de la familia de los TNF son conocidos por estar entre las citoquinas más pleiotrópicas, incluyendo un gran número de respuestas celulares, incluyendo proliferación, citotoxicidad, actividad anti-viral, actividades inmunoregulatorias, y la regulación transcripcional de diversos genes. La familia de TNF de citoquinas y receptores ha sufrido una gran expansión en los últimos años con el advenimiento de secuenciación de EST masiva. El TNFSF13b es el nombre oficial adoptado por el Congreso de TNF para BLyS, TALL-1, BAFF, THANK, neutroquina- α , y zTNF (para revisión véase Locksley y col. Cell 2001 104:487). TNFSF13b humano (hTNFSF13b) es una proteína unida a membrana de tipo II de 285 aminoácidos que posee un sitio de escisión de terminal N que permite la existencia de ambas proteínas de unión soluble y de membrana. Funcionalmente, TNFSF13b parece regular las respuestas inmunes a células B y a algunas células T.

Estudios de síndrome de choque séptico y otros trastornos que surgen de la sobreproducción de citoquinas inflamatorias han mostrado que un huésped afectado contará frecuentemente con altos niveles de citoquina liberando receptores de citoquina solubles o sintetizando anticuerpos anti-citoquina de alta afinidad. Se consideran procedimientos de tratamiento que mimetizan tales respuestas naturales como enfoques terapéuticos viables para el alivio de la enfermedad mediada por citoquina. Por tanto hay una necesidad bien reconocida de anticuerpos humanos que se unen a citoquinas, tales como TNFSF13b, que están implicados en la regulación de procesos inmunes celulares con gran afinidad y que tienen la capacidad de antagonizar la actividad de la citoquina diana *in vitro* e *in vivo*. Si bien la solicitud de patente internacional WO 00/50597 describe de forma no detallada anticuerpos dirigidos a TNFSF13b, tal solicitud no describe de forma específica las características estructurales o funcionales de tales anticuerpos.

El documento WO 98/18921 se refiere a una neutroquina, una proteína que es un miembro de la familia de proteínas TNF. Schneider y col. (J. Exp. Med., vol. 189, nº 11, 7 de Junio de 1999, páginas 1747-1756) describe el mismo miembro de la familia de proteína de TNF que se denomina BAFF.

La presente invención proporciona anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b, o porciones de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por gran afinidad de unión a polipéptidos de TNFSF13b, cinéticas de disociación lenta y la capacidad de antagonizar al menos una actividad *in vivo* y/o *in vitro* asociada con polipéptidos de TNFSF13b.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b que comprende:

- a. Nº ID SEC: 4 localizada en CDR 1 de la región variable de cadena ligera (LCVR);
- b. Nº ID SEC: 6 localizada en CDR 2 de la LCVR;
- c. Nº ID SEC: 8 localizada en CDR 3 de la LCVR;
- d. Nº ID SEC: 12 localizada en CDR 1 de la región variable de cadena pesada (HCVR);
- e. Nº ID SEC: 14 localizada en CDR 2 de la HCVR; y
- f. Nº ID SEC: 16 localizada en CDR 3 de la HCVR

Preferiblemente el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de acuerdo con la presente invención comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) como se muestra en Nº ID SEC: 2 y un polipéptido de región variable de cadena pesada (HCVR) como se muestra en Nº ID SEC: 10.

El anticuerpo de la presente invención se disocia preferiblemente de un polipéptido de TNFSF13b con una K_D de 1×10^{-8} M o inferior.

Preferiblemente el anticuerpo de la presente invención tiene una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior, según se determina por resonancia de plasmones de superficie.

El anticuerpo de la presente invención inhibe preferiblemente la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o inferior, preferiblemente con un CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior, más preferiblemente una CI_{50} de 1×10^{-10} M o inferior e incluso más preferiblemente una CI_{50} de 1×10^{-11} M o inferior.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD.

Preferiblemente la región constante de cadena pesada es IgG1 o IgG4 y es más preferiblemente IgG4.

Preferiblemente el IgG4 presenta una prolina sustituida por serina en la posición 231.

- 5 Se prefiere que el anticuerpo de la presente invención comprenda una región constante de cadena ligera kappa o lambda.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b que se puede obtener del hibridoma registrado como ATCC PTA-3674.

- 10 Un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b preferido de acuerdo con la presente invención, o fragmento del mismo, comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada:

```
QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
DILTGYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK
```

y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTSSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSENTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN R GEC
```

- 15 Incluso más preferido es un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b, o fragmento del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
 DILTGYYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S
 PGK

y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTSSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSENTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

- 5 En una realización preferida la presente invención proporciona un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b aislado que se une a un polipéptido de hTNFSF13b y se disocia del polipéptido de hTNFSF13b con una constante K_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior, determinado por resonancia de plasmones de superficie, que inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-8} o inferior.

En una realización preferida la invención proporciona un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b aislado que presenta las siguientes características:

- 10 a) inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o inferior;
- b) presenta una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 16; y
- c) presenta una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 8.

- 15 La invención también proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones agudas o crónicas asociadas con actividad de células B y algunas células T incluyendo, pero sin limitarse a estas, enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y/o neoplasia que comprende la administración de un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de la presente invención.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona secuencias que codifican los nuevos anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b, vectores que comprenden las secuencias de polinucleótidos que codifican anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b, células huésped transformadas con vectores que incorporan polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b, formulaciones que comprenden anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b y procedimientos de preparación y uso de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona el epítipo del antígeno al que se une los nuevos anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b. Por tanto la invención también proporciona un uso de un anticuerpo que une el epítipo

de la presente invención neutralizando la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones agudas o crónicas asociadas con actividad de células B y algunas células T incluyendo, pero sin limitarse a estas, trastornos autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y/o neoplasia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de la presente invención para uso como un medicamento.

La invención también comprende un artículo de fabricación que comprende un material de envase y un anticuerpo contenido dentro de dicho material de embalaje, en el que el anticuerpo neutraliza la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b va en detrimento y en la que el material de envase comprende una inserción de envase que indica que el anticuerpo neutraliza mediante unión de un epítipo de TNFSF13b, comprendiendo el epítipo lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105; y una inserción de envase que proporciona la administración de la forma de dosificación que da lugar a la neutralización de la actividad de TNFSF13b.

Fig. 1. gráfico que ilustra la inhibición de la proliferación inducida por hTNFSF13b y IL-1 de células T1165.17 con el anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4.

Fig. 2. gráfico que ilustra la neutralización de la proliferación inducida por hTNFSF13b con anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 en células B humanas primarias estimuladas con anti-IgM.

Con el fin de que la presente invención pueda ser entendida más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos.

Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina comprendida por cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente de 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente de 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Se clasifican las cadenas ligeras como kappa y lambda. Se clasifican las cadenas pesadas como gamma, mu, alpha, delta, o epsilon, y definen el isótopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (de forma abreviada en esta invención como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2, y CH3 para IgG, IgD e IgA, y 4 dominios, CH1, CH2, CH3, CH4 para IgM e IgE. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (de forma abreviada en esta invención como LCNR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación complementaria (CDR), diseminadas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas [Kabat, y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación N° 91-3242 (1991); Chothia, y col, J. Mol. Biol 196:901-917 (1987); Chothia, y col., Nature 342:878-883 (1989)]. Las características funcionales del anticuerpo para unirse a un antígeno particular son determinadas por las CDR.

En la presente descripción el término "anticuerpo" se pretende que se refiera a un anticuerpo monoclonal en sí. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, fragmento Fab, fragmento Fab', F(ab')₂, o fragmento FV de cadena simple. Preferiblemente el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que presentan regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos tienen diversas ventajas frente a anticuerpos no humanos y quiméricos para uso en terapia humana. Por ejemplo, la porción de efector de un anticuerpo humano puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruir las células diana más eficientemente con citotoxicidad dependiente complementaria (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)). Otra ventaja es que el sistema inmune humano no debería reconocer el anticuerpo humano como extraño y, por tanto la respuesta del anticuerpo frente a tal anticuerpo inyectado debería ser menor que frente a un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño. Además se ha descrito que anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de anticuerpos humanos. Anticuerpos humanos inyectados tienen una semivida esencialmente idéntica a la de anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

El término "hTNFSF13b" se refiere a la forma humana de un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral de ligandos descrita en las solicitudes de patente internacional WO98/18921 y WO00/50597 (denominado en estos documentos como neutroquina- α). El término "TNFSF13b" se pretende que comprenda hTNFSF13b así como también homólogos de hTNFSF13b derivados de otras especies. Los términos "hTNFSF13b" y "TNFSF13b" se pretende que incluyan formas de los mismos, que se pueden preparar mediante procedimientos de expresión recombinante convencionales o adquirirse comercialmente (Research Diagnostics Inc. Catálogo nº RDI-3113, rhuBAFF, Flanders, N.J.) así como también generarse sintéticamente.

La frase "propiedad biológica", "características biológicas" y el término "actividad" en referencia a un anticuerpo de la presente invención se usan de forma intercambiable en esta invención en incluyen, pero sin limitarse a estos, afinidad y especificidad de epítipo (por ejemplo, anticuerpo humano anti-hTNFSF13b que se une a hTNFSF13b), capacidad para antagonizar la actividad del polipéptido diana (por ejemplo, actividad de TNFSF13b), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo, y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables de un anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del polipéptido diana, o con otras proteínas o tejidos, en general), y capacidad para conservar altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características anteriormente citadas se pueden observar o medir usando técnicas reconocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmones en superficie, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, ejemplo 2), e inmunohistoquímica con secciones de tejido de diferentes fuentes incluyendo humano, primate o cualquier otra fuente que pueda ser necesaria. Se describen actividades particulares y propiedades biológicas de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

La frase "posición de contacto" incluye una posición de aminoácido en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que está ocupado con un aminoácido que contacta el antígeno. Si un aminoácido CDR contacta con el antígeno, entonces ese aminoácido se puede considerar que ocupa una posición de contacto.

"Sustitución conservativa" o "sustitución de aminoácido conservativo" se refiere a sustituciones de aminoácido, bien de mutaciones naturales o bien de manipulación humana, en las que los anticuerpos producidos con tales sustituciones tienen sustancialmente la misma (o mejor o reducida, como se pueda desear) actividad(es) que los anticuerpos descritos en esta invención.

El término "epítipo" tal como se usa en esta invención se refiere a una región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo. Un "epítipo inmunogénico" se define como la parte de una proteína que da lugar a una respuesta de anticuerpo cuando toda la proteína es el inmunógeno.

El término "une" tal como se usa en esta invención, se refiere por lo general a la interacción del anticuerpo con el epítipo del antígeno. Más específicamente el término "une" se refiere a la afinidad del anticuerpo con el epítipo del antígeno. La afinidad se mide con K_D .

El término "inhibir" o "inhibición" incluye el significado generalmente aceptado, que incluye neutralización, prohibición, conservación, restricción, ralentización, detención o inversión del progreso o gravedad de una enfermedad o afección.

El término "neutralización" o "antagonización" en referencia a un anticuerpo anti-TNFSF13b o la frase "anticuerpo que antagoniza la actividad de TNFSF13b" se pretende que se refiera a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo cuya unión a TNFSF13b da lugar a la inhibición de una actividad biológica inducida por polipéptidos de TNFSF13b. La inhibición de la actividad biológica de TNFSF13b se puede evaluar con la medida de uno o más indicadores *in vitro* o *in vivo* de actividad biológica de TNFSF13b incluyendo, pero sin limitarse a estos, proliferación inducida por TNFSF13b, secreción de inmunoglobulina inducida por TNFSF13b, prevención inducida por TNFSF13b de apoptosis de células B, o inhibición de la unión al receptor en un ensayo de unión al receptor de TNFSF13b. Los indicadores de actividad biológica de TNFSF13b se pueden evaluar con uno o más de los diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Moore, P.A., y col., Science, 285:260-263 (1999); Schneider, P., y col, J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Shu, H., y col, J. Leuko. Biol, 65:680-683 (1999); Mukhopadhyay, A., y col, J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999); Mackay, F. y col, J. Exp. Med., 190:1697-1710 (1999); Gross, J.A., y col, Nature, 404:995-999 (2000); y ejemplo 2). Preferiblemente la capacidad de un anticuerpo para neutralizar o antagonizar la actividad de TNFSF13b se valora con la inhibición de proliferación de células B como se muestra en el ejemplo 2.

El término " K_{off} ", tal como se usa en esta invención, se pretende que se refiera a la constante de velocidad off para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", tal como se usa en esta invención, se pretende que se refiera a la constante de disociación de la velocidad "off" dividida por la velocidad "on", de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Para los fines de la presente invención K_D se determinó como se muestra en el ejemplo 4.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. De forma ordinaria se prepara un anticuerpo aislado con al menos una etapa de purificación. En realizaciones preferidas el anticuerpo se purificará (1) en más de 95% en peso del anticuerpo según se determina con el procedimiento de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, y (2) para homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones de reducción o de no reducción usando azul de Coomassie, o preferiblemente, tinte de plata. Preferiblemente un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNFSF13b sustancialmente libre de anticuerpo que se unen específicamente a antígenos distintos de polipéptido de hTNFSF13b).

La frase "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra simple o de hebra doble, pero preferiblemente es ADN de hebra doble.

La frase "moléculas de ácido nucleico aislado", tal como se usa en esta invención en referencia a ácidos nucleicos que codifica anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, HCVR, LCVR, CDR3) que unen el polipéptido de hTNFSF13b, incluye una molécula de ácido nucleico en la que la secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo, o porción de anticuerpo, están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que unen antígenos distintos del polipéptido de hTNFSF13b, cuyas otras secuencias pueden flanquear naturalmente el ácido nucleico en ADN genómico. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región HCVR de un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b no contiene otras secuencias que codifican regiones HCVR que unen antígenos distintas del polipéptido de hTNFSF13b.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de 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 hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que presentan un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras introducción en la célula huésped, y con ello se replican a lo largo del genoma del huésped. Adicionalmente ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma operativa. Tales vectores se denominan en esta invención "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante se encuentran frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable siendo el plásmido la forma de vector más habitualmente usada. Sin embargo la invención se pretende que incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus con defecto de replicación, adenovirus, y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.

El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando está dispuesto en una interrelación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un líder de presecuencia o secretorio está unido de forma operativa a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de forma operativa a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión del ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia de codificación si está posicionado de modo que facilite la traslación. En general "unido de forma operativa" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y en el caso de un líder secretorio, contiguo y en marco de lectura. Sin embargo los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo con ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

El término "recombinante" en referencia a un anticuerpo incluye anticuerpos que se preparan, expresan, generan o aíslan con medios recombinantes. Ejemplos representativos incluyen anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo humano combinatorial recombinante, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes o anticuerpos de inmunoglobulina humana preparados, expresados, generados o aislados por cualquier medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

La frase “célula huésped recombinante” (o sencillamente “célula huésped”) incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debería entender que tales términos se pretende que se refieran no sólo a la célula particular sino a la progenidad de tal célula. Debido a que pueden tener lugar ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido bien a la mutación o a influencias ambientales, tal progenidad no puede, de hecho, ser idéntica a la célula padre, pero se incluyen dentro del alcance del término “célula huésped” como se usa en esta invención.

Pueden también someterse anticuerpos humanos recombinantes a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto las secuencias de aminoácido de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de los relacionadas con secuencias HCVR y LCVR de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal humana *in vivo*.

Se pueden usar animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del haz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tal ratón mutante de línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, y col, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 90:2551-2555, (1993); Jakobovits, y col, Nature, 362:255-258, (1993); Bruggemann, y col, Year in Immun., 7:33 (1993); Nature 148:1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996); Gross, J.A., y col, Nature, 404:995-999 (2000); y patentes de Estados Unidos números 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825 y 5.545.806 (cada una de ellas se incorpora a esta invención como referencia en su totalidad a todos los efectos)). Se pueden producir también anticuerpos humanos en bibliotecas de exhibición de fago (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks, y col, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole y col. y Boerner, y col. se encuentran también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, y col, Monoclonal Antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner, y col, J. Immunol, 147(l):86-95 (1991)).

“Recipiente” significa cualquier receptáculo y cierre adecuado para almacenamiento, expedición, dispensión y/o manipulación de un producto farmacéutico.

“Material de envasado” significa un dispositivo adaptado al cliente que permite la administración conveniente y/o dispositivos auxiliares que ayudan en el suministro, educación y/o administración. El material de envasado puede mejorar la administración de anticuerpos al paciente, reducir o mejorar el tiempo de instrucción educacional para el paciente, proporcionar una plataforma de mejores estudios económicos de salud, y/o limitar la carga de trabajo del canal de distribución. También el material de envasado puede incluir, pero sin limitarse a esto, un envase basado en papel, envase retractilado, envasado *see-through top*, cupones de uso clínico, materiales educativos, suministros auxiliares, y/o dispositivo de administración.

“Inserción de envase” significa información que acompaña al producto que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y datos de eficacia requeridos que permiten al facultativo, farmacéutico y paciente tomar una decisión fundamentada en lo que respecta al uso del producto, y/o información educativa para el paciente. La inserción del envase se refiere por lo general a la “etiqueta” de un producto farmacéutico.

Un “sujeto” significa un mamífero; preferiblemente un humano en necesidad de un tratamiento. En lo que respecta a la presente invención sujetos en necesidad de tratamiento incluyen mamíferos que sufren de, o son proclives a sufrir de un trastorno en el que la actividad del TNFSF13b va en detrimento, por ejemplo, enfermedades inmunes, incluyendo enfermedades autoinmunes, y enfermedades inflamatorias. Trastornos preferidos incluyen, pero sin limitarse a estos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad del intestino inflamado, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órgano, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, infertilidad femenina, trombocitopenia autoinmune, enfermedad tiroidea autoinmune, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren y cánceres, en particular linfomas o mielomas de células B o T.

Se describen diversos aspectos de la invención con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que son específicos de y neutralizan polipéptidos de hTNFSF13b bioactivos. También se describen secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de anticuerpo que son muy específicas de y neutralizan polipéptidos de hTNFSF13b cuando están unidos a estos. Esta alta especificidad permite a los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b y anticuerpos monoclonales humanos con poca especificidad, ser inmunoterapia de enfermedades asociadas con TNFSF13b.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en las N° ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16 y a que se une a epítipo de polipéptido de TNFSF13b con alta afinidad, se disocia de un enlace del polipéptido de TNFSF13b con una constante de velocidad K_{off} baja de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior, y presenta la capacidad de antagonizar actividad de polipéptido de TNFSF13b. En una realización el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende un polipéptido seleccionado del grupo constituido por: polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende al menos dos de los polipéptidos seleccionados del grupo constituido por: polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido de CDR1 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende al menos tres de los polipéptidos seleccionados del grupo constituido por: polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido CDR1 de de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende al menos cuatro de los polipéptidos seleccionados del grupo constituido por: polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y 3 polipéptido CDR de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende al menos cinco de los polipéptidos seleccionados del grupo constituido por: polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende los polipéptidos de polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en N° ID SEC: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en N° ID SEC: 16.

Más preferiblemente, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) como se muestra en N° ID SEC: 2 o un polipéptido de región variable de cadena pesada (HCVR) como se muestra en N° ID SEC: 10. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende el polipéptido de LCVR como se muestra en N° ID SEC: 2 y el polipéptido de HCVR como se muestra en N° ID SEC: 10.

En realizaciones preferidas el anticuerpo humano aislado se disocia de un polipéptido de TNFSF13b unido con una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o inferior, e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o inferior. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo humano aislado se disocia de un epítipo de polipéptido de TNFSF13b unido con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o inferior e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o inferior. En una realización incluso más preferida el anticuerpo humano anti-TNFSF13b aislado se disocia de un polipéptido de hTNFSF13b unido con una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ o inferior e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o inferior. Ejemplos de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b que cumplen los criterios cinéticos y de neutralización anteriormente citados incluyen anticuerpos 4A5-3.1.1-B4.

El anticuerpo humano anti-hTNFSF13b más preferido de la presente invención se designa en esta invención como 4A5-3.1.1-B4. 4A5-3.1.1-B4 tiene secuencias de polipéptido en LCVR y HCVR como se muestra en N° ID SEC: 2 y N° ID SEC: 10, respectivamente. La secuencia de polinucleótidos que codifica la LCVR y HCVR de 4A5-3.1.1-B4 se muestra en N° ID SEC: 1 y N° ID SEC: 9, respectivamente. Las propiedades de los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b de la presente invención se describen de forma específica en los ejemplos. Es particularmente notable la gran afinidad por polipéptido TNFSF13b, cinéticas de disociación lentas, y gran capacidad para antagonizar la actividad de polipéptido de TNFSF13b demostrada por 4A5-3.1.1-B4.

La K_{off} de un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b se puede determinar mediante resonancia de plasmones de superficie como se describe en general en el ejemplo 4. Por lo general el análisis por resonancia de plasmones de superficie mide las interacciones de unión a tiempo real entre ligando (polipéptido de TNFSF13b recombinante inmovilizado en una matriz de biosensor) y analito (anticuerpos en solución) mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Se puede llevar a cabo el

análisis por SPR mediante inmovilización del analito (anticuerpos en una matriz de biosensor) y presentar el ligando (TNFSF13b recombinante en solución).

En un aspecto la presente invención se refiere también a líneas celulares que producen los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b de la presente invención. El aislamiento de líneas celulares que produce anticuerpos monoclonales de la invención se puede llevar a cabo usando técnicas de barrido rutinarias conocidas en la técnica. Se ha registrado un hibridoma que produce un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de la presente invención con ATCC, (ATCC PTA-3674) como se describe en esta invención.

Se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión en huésped para expresar los anticuerpos de la presente invención incluyendo bacterias, levadura, baculovirus, planta, y sistemas de expresión en mamífero (así como también sistemas de expresión que muestran fago). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUCI 19 (Sfi). Se conocen también en la técnica otros sistemas de expresión de anticuerpo y se contemplan en la presente invención.

Se puede preparar un anticuerpo de la invención mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo tal que las cadenas ligera y pesadas se expresan en la célula huésped. Preferiblemente los anticuerpos recombinantes se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, de tal medio se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células huésped.

El ADN aislado que codifica la región HCVR se puede transformar en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante unión operativa del ADN que codifica HCVR en otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de DNA de genes de región constante de cadena pesada son conocidas en la técnica y se pueden obtener fragmentos de ADN que comprenden estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica en estas como describe Kabat (Kabat, y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), pero lo más preferiblemente es una región constante IgG4. De forma alternativa la parte de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento Fab', F(ab')₂, o una cadena simple de fragmento FV. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, se puede unir de forma operativa el ADN que codifica la HCVR con otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región LCVR se puede transformar en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera Fab) mediante unión operativa del ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de ADN de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica y se pueden obtener fragmentos de ADN que comprenden estas regiones mediante ampliación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFV, los fragmentos de ADN que codifican las HCVR y LCVR se unen de forma operativa con otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser(Gly4-Ser)₃, tal que las secuencias HCVR y LCVR se pueden expresar como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones LCVR y HCVR unidas por el conector flexible (véase por ejemplo, Bird y col. Science 242:423-426 (1988); Huston, y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); McCafferty, y col, Nature 348:552-554 (1990)).

Para expresar los anticuerpos de la invención, ADN que codifica cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos como se describió anteriormente, se insertan en vectores de expresión tal que los genes se encuentren operativamente unidos a secuencias de control transcripcional y translacional. El gen de anticuerpo está ligado en un vector tal que secuencias de control transcripcionales y translacionales dentro del vector sirven para su función pretendida de regulación de la transcripción y translación del gen de anticuerpo. Las secuencias de control de vector de expresión y de expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vector separado o, de forma más típica, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Se insertan los genes de anticuerpo en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector de gen de anticuerpo, o ligadura de extremo como sino hay presentes sitios de restricción). De forma adicional o alternativa el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo humano anti-hTNFSF13b desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo humano anti-hTNFSF13b se puede clonar en el vector tal que

el péptido de señal esté unido en marco con el término amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína distinta de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Secuencias regulatorias comprenden promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o translación de los genes de cadena de anticuerpo. Se apreciará por los especialistas en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias regulatorias puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Secuencias regulatorias preferidas para expresión de células huésped en mamíferos incluyen elementos virales que dirigen niveles elevados de expresión de proteína en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus 40 de simios (SV40) (tal como el potenciador/mejorador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)) y polioma.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tal como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, de forma típica el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, o en una célula huésped en la que el vector se ha introducido. Genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas se transfecta el(los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras en una célula huésped mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se pretende que incluyan una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Si bien es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y lo más preferiblemente células huésped de mamífero, es lo más preferido debido a que tales células eucarióticas y en particular células de mamífero se ensamblan con mayor probabilidad que las células procarióticas y secretan un anticuerpo activo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Células huésped de mamífero preferidas para expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario del hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, Mol. Biol., 159:601-621 (1982)), células del mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen genes de anticuerpo que codifican vectores de expresión recombinante en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Se pueden recuperar anticuerpos del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteína convencionales.

Se pueden usar también células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFV. Se entenderá que se encuentran dentro del alcance de la presente invención variaciones del procedimiento anterior. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica bien la cadena ligera o bien la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de esta invención. Se pueden usar también técnicas de ADN recombinante para eliminar algunos o todos los ADN que codifican cualquiera o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a hTNFSF13b. Las moléculas expresadas de tales moléculas de ADN truncadas están comprendidas también por los anticuerpos de la invención. En un sistema para expresión recombinante de un anticuerpo de la invención se introduce un vector de expresión recombinante que codifica ambas cadenas pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo en células dhfr-CHO con transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están unidos de forma operativa a elementos regulatorios de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un potenciador de CMV/elemento regulatorio del promotor AdMLP o un potenciador de SV40/ elemento regulatorio del promotor AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector que usa selección/amplificación de metotrexato. Las células huésped de transformante seleccionadas son cultivadas para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Se pueden expresar anticuerpos o porciones de unión al antígeno del mismo de la invención en un animal (por ejemplo,

un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., y al. Nucl. Acids Res., 20:6287-6295(1992)). Se pueden modificar también células de plantas para crear plantas transgénicas que expresan la porción de unión al anticuerpo o antígeno del mismo, de la invención.

A la vista de lo anterior, otro aspecto de la invención concierne a ácidos nucleicos, vectores, y composiciones de células huésped que se pueden usar para expresión recombinante de los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención. Preferiblemente la invención se caracteriza por ácidos nucleicos aislados que codifican CDR de 4A5-3.1.1-B4, o la región variable de cadena pesada y/o ligera completa de 4A5-3.1.1-B4. De acuerdo con lo anterior, en una realización la invención se caracteriza por un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que codifica la CDR3 de cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 16. Preferiblemente el ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada de anticuerpo codifica además una CDR2 de cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 14. Más preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada de anticuerpo codifica además una CDR1 de cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 12. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 10 (la región HCVR completa de 4A5-3.1.1-B4).

En otras realizaciones, la invención se caracteriza por un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que codifica la CDR3 de cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 8. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera de anticuerpo codifica adicionalmente una CDR1 de cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 2 (la región LCVR completa de 4A5-3.1.1-B4).

En otras realizaciones, la invención se caracteriza por un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que codifica la CDR3 de cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 8. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera de anticuerpo codifica además una CDR1 de cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 2 (la región LCVR completa de 4A5-3.1.1-B4).

En otra realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un dominio de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 16 (es decir, la CDR3 de HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Este ácido nucleico puede codificar sólo la región CDR3 o, más preferiblemente, codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo (HCVR). Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una HCVR que presenta un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 14 (es decir, la CDR2 de HCVR de 4A5-3.1.1-B4) y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 12 (es decir, la CDR1 de HCVR de 4A5-3.1.1-B4).

Aún en otra realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 2 (es decir, la LCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de N° ID SEC: 1, si bien el especialista en la técnica apreciará que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 2. El ácido nucleico puede codificar solo la LCVR o puede codificar también una región constante de cadena ligera de anticuerpo, unida de forma operativa a la LCVR. En una realización este ácido nucleico es un vector de expresión recombinante.

Aún en otra realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 10 (es decir, la HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de N° ID SEC: 9, si bien el especialista en la técnica apreciará que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 10. El ácido nucleico puede codificar solo la HCVR o puede codificar también una región constante de cadena pesada, unida de forma operativa a la HCVR. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una región constante de IgG1 o IgG4. En una realización este ácido nucleico es un vector de expresión recombinante.

Los especialistas en la técnica son conscientes de que modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden dar lugar a un anticuerpo que muestre características funcionales equivalentes o superiores cuando se comparan con el anticuerpo original. Alteraciones en los anticuerpos de la presente invención pueden incluir una o más inserciones, deleciones, sustituciones, truncados, fusiones de aminoácidos y similares, bien de

mutaciones naturales o bien de manipulación humana. La presente invención comprende anticuerpos descritos en esta invención que comprenden adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos con la condición de que los anticuerpos sustituidos tengan sustancialmente la(s) misma(s) (o mejor o reducida, como sea deseable) actividad(es) que los anticuerpos descritos en esta invención. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene 3 sustituciones o menos conservativas. Preferiblemente una CDR de la presente invención tiene 2 sustituciones o menos sustituciones conservativas. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene una sustitución conservativa. El especialista en la técnica reconocerá que anticuerpos que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas se pueden preparar con una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un número de procedimientos de mutagénesis, incluyendo ensamblaje por PCR, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos de Kunkel (dut-ung-) y tiofosfato (kit de Amersham Sculptor). Se muestran en la tabla 1 sustituciones conservativas de interés junto con sustituciones preferidas.

Tabla 1. Sustituciones conservativas

Residuo	Sustituciones	Sustitución preferida
Ala (A)	gly, val, leu ile, ser met, thr	Val
Arg (R)	lys gln, asn, his	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Ala, ile, leu, pro, ser, met val val	Ala
His (H)	Asn, gln, lys arg	Arg
Ile (I)	Lieu, val, met ala, phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, ile, val, met, ala phe	Ile
Lys (K)	Arg, gln, asn, his	Arg
Met (M)	Ala, gly, ile, leu, phe, ser, val	Leu
Phe (F)	Leu, val, ile, ala, trp, tyr	Tyr
Pro (P)		
Ser (S)	Ala, gly, ile, leu, met, thr, val	Thr
Thr (T)	Ala, gly ile, leu, met, ser val	Ser
Trp (W)	trp phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	Phe
Val (V)	Ala, ile leu, met, ser, met, norleu	Leu

La invención también proporciona vectores de expresión recombinantes que codifican un anticuerpo que comprende un polipéptido seleccionado del grupo constituido por un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 2, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 4, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 6, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 8, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 10, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 12, un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 14; y un polipéptido como se muestra en N° ID SEC: 16.

La invención también proporciona vectores de expresión recombinantes que codifican tanto una cadena pesada de anticuerpo como una cadena ligera de anticuerpo. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

- a) una cadena pesada de anticuerpo que presenta una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 10; y
- b) una cadena ligera de anticuerpo que presenta una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC: 2.

- 5 Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad, fase inversa, cromatografía en columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y son más
- 10 preferidas de 98 a 99% o más homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos se pueden usar terapéutica o profilácticamente como se refiere en esta invención.

- Los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. De forma típica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo o porción
- 15 de anticuerpo de la invención y un diluyente, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas para administración son diseñadas para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usa de forma apropiada diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, solubilizantes, agentes de isotonicidad, estabilizantes y similares.

- 20 Se puede administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de la presente invención a un mamífero en riesgo de o que muestre síntomas relacionados con la autoinmunidad o patología tal como lupus eritematoso sistémico usando técnicas de administración convencionales por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o supositoria.

- 25 Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración por vía parenteral. Se prefiere liberación sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Vehículos adecuados para tales inyecciones son simples. Adicionalmente, no obstante, se puede efectuar la administración mediante las membranas de la mucosa por medio de aerosoles nasales o supositorios. Formulaciones adecuadas para tales modos de administración son bien conocidos e incluyen de forma
- 30 típica tensioactivos que facilitan la transferencia a través de la membrana.

- Las composiciones farmacéuticas deben ser de forma típica estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Por lo tanto se pueden filtrar en condiciones de esterilidad composiciones farmacéuticas tras fabricación de la formulación, o se pueden preparar de otra forma microbiológicamente aceptables. Una composición
- 35 típica para infusión por vía intravenosa podría tener un volumen de hasta 250 ml de fluido, tal como solución de Ringer y 1-100 mg por ml, o más en concentración de anticuerpo. Agentes terapéuticos de la invención se puede congelar o liofilizar para almacenamiento y reconstitución en un vehículo estéril adecuado antes del uso. La liofilización y reconstitución se puede llevar a cabo en grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo, inmunoglobulinas convencionales, anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que anticuerpos IgG). Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar. El pH de la formulación se
- 40 seleccionará para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y confortabilidad del paciente cuando se administra. Por lo general se tolera bien el pH entre 6 y 8.

- TNFSF13b juega un papel crítico en la patología asociada con una variedad de enfermedades que implican factores inmunes e inflamatorios. Por lo tanto se puede usar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de la invención para tratar trastornos en los que la actividad del TNFSF13b va en
- 45 detrimento, por ejemplo, enfermedades inmunes que incluyen enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Trastornos preferidos incluyen, pero sin limitarse a estos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad del intestino inflamado, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo a transplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con transplante de órganos, sarcoidosis, enfermedades infecciosas,
- 50 enfermedades parasitarias, infertilidad femenina, trombocitopenia autoinmune, enfermedad del tiroides autoinmune, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren, y cánceres, en particular linfomas o mielomas de células B o T.

Más preferiblemente, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b y/o fragmento de anticuerpo de la invención se usa para tratar lupus eritematoso sistémico.

Se contempla también en esta invención el uso del anticuerpo de un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos anteriormente citados en los que la actividad del TNFSF13b va en detrimento.

En ciertas situaciones un anticuerpo de la invención se co-formulará con y/o co-administrará con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se usan en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias. Tales terapias de combinación pueden usar de forma ventajosa menores dosificaciones de los agentes terapéuticos administrados, evitando por tanto posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Se apreciará por el especialista en la técnica que los anticuerpos de la invención se usan como parte de una terapia de combinación, puede ser deseable una dosificación inferior de anticuerpo cuando se administra solo el anticuerpo a un sujeto (por ejemplo, se puede conseguir un efecto terapéutico sinérgico con el uso de terapia de combinación que, en cambio, permite el uso de una dosis inferior del anticuerpo para conseguir el efecto terapéutico deseado).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y para periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para dar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o en detrimento del anticuerpo o parte del anticuerpo pesan más con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva a dosificaciones y para periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. De forma típica, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una fase prematura de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Se pueden ajustar regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo se puede administrar un bolo simple, diversas dosis divididas en el tiempo se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indica con las exigencias de la situación terapéutica.

Dada su capacidad para unirse a hTNFSF13b se pueden usar anticuerpos de la invención para detectar polipéptidos de TNFSF13b (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como ensayos inmunsorbentes de enzimas ligados (ELISA), un inmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La invención proporciona un procedimiento para detectar TNFSF13b en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar bien el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a hTNFSF13b o anticuerpo no unido (o porción de anticuerpo), para detectar con ello hTNFSF13b en la muestra biológica. El anticuerpo está etiquetado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Sustancias detectables adecuadas incluyen diversos enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinil-amina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{251}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

De forma alternativa para etiquetar el anticuerpo se puede ensayar TNFSF13b en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición que usa patrones de TNFSF13b etiquetados con una sustancia detectable y un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b no marcado. En este ensayo la muestra biológica, los patrones de TNFSF13b no marcados y el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b se combinan y se determina la cantidad de patrón de TNFSF13b etiquetado unido al anticuerpo no etiquetado. La cantidad de TNFSF13b en la muestra biológica es inversamente proporcionar a la cantidad de patrón de rTNFSF13b etiquetado unido al anticuerpo humano anti-hTNFSF13b.

En otra realización, la presente invención proporciona un uso de un anticuerpo que neutraliza la actividad de TNFSF13b mediante unión de un epítipo de TNFSF13b. Se identificó el epítipo como se describe en el ejemplo 10. Como referencia la porción soluble en hTNFSF13b se representa como sigue:

TNFSF13b humano	1	AVQGPEETVT	QDCLQLIADS	ETPTIQGSY	TFVPWLLSFK	40
	41	RGSALEEKEN	KILVKETGYF	FIYGQVLYTD	KTYAMGHLIQ	80
	81	RKKVHVFGDE	LSLVTLFRCI	QNMPETLPNN	SCYSAGIAKL	120
	121	EEGDELQLAI	PRENAQISLD	GDVTFFGALK	LL	152

Los aminoácidos de hTNFSF13b implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprende al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden al menos dos de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden al menos tres de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden al menos cuatro de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109.

En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105.

En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden ácido glutámico en la posición 105 y al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden treonina en la posición 106 y al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden leucina en la posición 107 y al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden asparagina en la posición 109 y al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo constituido por: lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73.

En otra realización los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b nuevos comprenden lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105.

Los siguientes ejemplos se pretende que ilustren la invención pero no limitarla.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales humanos anti-hTNFSF13b

Se generaron anticuerpos monoclonales usando la tecnología HuMAb-Mouse™ de Medarex mediante inmunización de los ratones con hTNFSF13b soluble (aminoácidos 133-285, adquiridos en RDI, Flanders, NJ). Se usaron ambos ratones HCo7 y HCo2. Se inmunizaron ratones con 15 µg a 50 µg de hTNFSF13b soluble en RIBI, adyuvante de Freund completo o adyuvante de Freund incompleto. Fueron inyectados ocho ratones que producen títulos de anticuerpo en suero en hTNFSF13b por vía i.v. con 10 µg de hTNFSF13b en PBS. Se cosecharon los bazo tres días más tarde de cada ratón y se condensaron células de mieloma de acuerdo con el procedimiento descrito por Zola (Zola, H. Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Boca Raton, FL. (1987)).

Se ensayaron hibridomas para unirse a hTNFSF13b y se aseguró que fueran expresados en cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Se detectó unión del anticuerpo a hTNFSF13b mediante ELISA como sigue:

Se recubrieron placas con 50 µl de 5 µg/ml de hTNFSF13b en PBS durante la noche a 4° C. Se vaciaron y bloquearon luego con las placas con 100 µl de PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS) + 5% de suero de pollo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBST se drenaron las placas y se añadió por pocillo

100 µl de reactivos secundarios diluidos (HRP-HuIgGFc, Jackson cat nº 109-036-098 o HRP-HuKappa, Bethyl cat nº A80-115P; 1:5000 en tampón de bloqueo). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente se lavaron las placas tres veces como se describió anteriormente. Se desarrollaron las placas usando 10 ml de tampón de citrato fosfato pH 4,0, 80 µl de ABTS, 8 µl de H₂O₂ por placa. Tras incubación de 30 min. a 1 hora a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de las placas A415-A490. Los hibridomas que mostraron unión a hTNFSF13b y que eran cadena pesada de hulgG y cadena ligera kappa humana kappa se seleccionaron para la subclonación.

Se concentró el medio de cultivo celular de hibridomas subclonados en sistemas de filtración tangencial Amicon ProFlux MI 2 usando unas membranas Amicon S3Y30 UF. Se pasó el medio concentrado por columnas de proteína-A Sepharose (columna de 5 a 20 ml) a un caudal de 5 ml/min. Se lavaron las columnas con tampón A (PBS, pH 7,4) hasta que volviese la absorbancia al basal y se eluyeron los polipéptidos unidos con ácido cítrico 50 mM, pH 3,2. Se neutralizaron inmediatamente fracciones con Tris 1 M, pH 8,0. Se analizaron luego fracciones mediante SDS-PAGE. Se reunieron fracciones que contienen anticuerpo y se concentraron usando una unidad de filtro centrífugo Ultrafree (Millipore, corte de peso molecular en 10 kDa).

Ejemplo 2: actividad funcional de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b

Se midió la actividad neutralizante de los anticuerpos humano anti-hTNFSF13b de la invención usando una línea celular B dependiente IL-1 murina, T1165.17. Se lavaron las células tres veces con medio de ensayo (RPMI1640 que contiene PBS al 10%, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y penicilina, estreptomicina y fungizona) para eliminar IL-1. Se resuspendieron las células a 100.000 células/ml en medio de ensayo que contiene 2,5 ng/ml de huTNFSF13b soluble y se dispusieron a 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37° C en CO₂ al 5%. Se incubaron los sobrenadante en hibridomas positivos de ELISA a una dilución 1:4. Se añadió cuarenta y ocho horas después, 20 µl de solución Promega CellTiter 96 Aqueous One (Madison, WI) y se incubó la placa durante 5 horas más a 37° C en CO₂ al 5%. Se leyó la absorbancia a A490 para medir la proliferación. Se muestra en la figura 1 un ejemplo de actividad de neutralización para uno de los sobrenadantes del hibridoma, 4A5-3.1.1-B4. Como control se añadieron los anticuerpos a células estimuladas con IL-1. No hubo evidencia de inhibición de proliferación estimulada con IL-1, solo la proliferación estimulada con hTNFSF13b.

Se ensayaron los anticuerpos neutralizantes en relación a la capacidad de inhibir la proliferación de células B humanas primarias aumentadas con TNFSF13b en respuesta a la estimulación con anti-IgM. Se aislaron las células B humanas primarias de sangre humana usando selección positiva de CD19 usando el sistema de aislamiento magnético MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se añadieron las células B a pocillos de una placa de 96 pocillos a 2×10^5 células por pocillo en RPMI completo que contiene FCS al 10% (RPMI completo es RPMI 1640 que contiene L-glutamina 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y β-mercaptoetanol 1×10^{-5} M). Se recubrieron algunos de los pocillos con 10 µg/ml de IgM anti-humano en PBS (BD PharMingen, Clone G20-127), durante la noche a 4° C y se lavaron cuatro veces con PBS antes del uso. Se estimularon algunas de las células con hTNFSF13b soluble (25 ng/ml) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-hTNFSF13b neutralizante (2,5 µg/ml). La figura 2 ilustra la capacidad de 4A5-3.1.1-B4 para neutralizar el efecto estimulador de hTNFSF13b.

Ejemplo 3: caracterización de anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos anti-hTNFSF13b neutralizantes eran bien IgG1 humano o IgG4 humano. Estos se ensayaron también en cuanto a su capacidad para unirse a hTNFSF13b en un estado desnaturalizado, es decir, hTNFSF13b separado en SDS-PAGE y moteado sobre nitrocelulosa. Todos los anticuerpos neutralizantes fallaron al unir hTNFSF13b en un Western blot mientras que diversos agentes no neutralizantes fueron capaces de hacerlo.

Se llevaron a cabo experimentos que usan el sistema BIAcore para determinar si anticuerpos no neutralizantes y anticuerpos neutralizantes se unen al mismo sitio en hTNFSF13b. Primero se cubrió 4A5-3.1.1-B4 en una placa seguido de inyección de hTNFSF13b y luego una cantidad para saturación de un anticuerpo no neutralizante. Una vez alcanzada la saturación se dispuso una concentración elevada de 4A5-3.1.1-B4 sobre la placa. Once de los anticuerpos monoclonales no neutralizantes eran incapaces de completar el mismo sitio de unión que 4A5-3.1.1-B4. Un hibridoma no neutralizante era capaz de bloquear la unión de 4A5-3.1.1-B4 en aproximadamente 45%, lo que indica que puede tener un epítipo próximo al epítipo 4A5-3.1.1-B4.

Usando el mismo diseño experimental se determinó también que el mAb neutralizante, 4A5-3.1.1-B4, pudo completarse para el mismo sitio de unión que uno de los receptores para hTNFSF13b, TACI. Estos experimentos sugieren que TACI-Fc y 4A5-3.1.1-B4 puede tener epítopos de solapamiento en hTNFSF13b.

Se inmovilizó 4A5-3.1.1-B4 en una fase sólida pasando la solución de anticuerpo por una resina IMAC cargada con Co⁺². Tras la unión el cobalto se oxidó al estado +3 mediante incubación de la resina con una solución de peróxido

diluido. Tras lavar la resina se pasó por la columna hTNFSF13b nativo y hTNFSF13b que se modificó (mediante reducción/alquilación o mediante desnaturalización térmica). Después de lavar se eluyó la proteína unida con una solución ácida y se analizaron las proteínas eluidas con MALDI MS. 4A5-3.1.1-B4 se unió hTNFSF13b recombinante nativo, pero no se unió ni químicamente ni térmicamente a hTNFSF13b modificado. Por tanto el 4A5-3.1.1-B4 parece reconocer un epítipo conformacional en hTNFSF13b soluble.

Se incubó hTNFSF13b (RDI) soluble recombinante con 4A5-3.1.1-B4 o anticuerpo policlonal de conejo anti-TNFSF13b (MoBiTec, Marco Island, FL; frente a aminoácidos 254 a 269 de hTNFSF13b) en hielo durante 2 horas y se aplicó la mezcla de proteína a una HPLC de exclusión por tamaño (dos columnas TosoHaas TSK-GEL G3000PW en tándem) equilibradas en PBS a un caudal de 0,25 ml/min. Se eluyeron las proteínas con PBS. Se analizaron como controles soluciones de anticuerpo y se analizaron por separado. TNFSF13b humano eluyó desde la columna de exclusión de tamaño a una posición coherente con un trímero de moléculas TNFSF13b. La elución de hTNFSF13b trimérico se desplazó hasta un punto temporal anterior en presencia de 4A5-3.1.1-B4 pero no en presencia de anticuerpos policlonales anti-TNFSF13b lo que indica la unión de hTNFSF13b trimérico con el anticuerpo 4A5-3.1.1-B4. Estos datos sugieren que el mAb 4A5-3.1.1-B4 neutralizante se une a un epítipo conformacional en hTNFSF13b.

Ejemplo 4: medida de afinidad de anticuerpos monoclonales con BIAcore

Se midió la afinidad de diversos anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b con hTNFSF13b usando un sistema instrumental de BIAcore 2000. El sistema usa las propiedades ópticas de la resonancia de plasmones de superficie para detectar la alteración en la concentración de proteína de moléculas que interactúan en una matriz de biosensor de dextrano. Excepto cuando se indique todos los reactivos y materiales se adquirieron en BIAcore AB (Upsala, Suecia). Se llevaron a cabo todas las medidas a 25° C. Se disolvieron muestras en tampón HBS-EP (NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% (p/v) de tensioactivo P-20, y HEPES 10 mM, pH 7,4). Se inmovilizó IgG anti-ratón de cabra (específico de Fc; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en célula de flujo 1 en una placa con sensor CM5 usando el kit de acoplamiento de amina. Se inmovilizó IgG anti-jumano de cabra (específico de Fc; Jackson Immunoresearch) en células de flujo 2 también por acoplamiento de amina. Ambos anticuerpos se inmovilizaron para llegar a 700 unidades de respuesta cada una.

Se evaluó la unión de hTNFSF13b recombinante (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ) usando ciclos analíticos múltiples. Cada ciclo se llevó a cabo con un caudal de 30 µl/min. y consistió en las siguientes etapas: inyección de 150 µl de 4A5-3.1.1-B4 a 20 µg/ml, inyección de 250 µl de hTNFSF13b (partiendo a 50 nM y usando diluciones en serie 2 veces para cada ciclo) seguido en 15 minutos para disociación, y regeneración usando 90 µl de clorhidrato de glicina 10 mM, pH 1,5.

Se evaluaron las velocidades de asociación y disociación para cada ciclo usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir en el software BIAevaluation. Se determina que la K_D de 4A5-3.1.1-B4 para hTNFSF13b es 38 pM.

Ejemplo 5: clonación y secuenciación de regiones de unión al antígeno de cadena pesada y ligera

Se clonó la región variable para la cadena pesada y ligera para la neutralización de mAb 4A5-3.1.1-B4 humano y se secuenció usando los siguientes protocolos.

Se preparó ARNm en 2×10^6 células de hibridoma usando el protocolo Micro-Fast Track (Invitrogen) suministrado con el kit. Se preparó ADNc en 200 µl de precipitado en etanol de ARNm usando kit de ciclo de ADNc (Invitrogen) mediante agitación de la alícuota de ARNm durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4° C seguido por lavado del agregado con etanol al 70%. Se resuspendió el agregado secado en aire en 11,5 µl de agua estéril y se preparó ADNc siguiendo las instrucciones del kit. Se omitió la segunda ronda opcional de síntesis de ADNc pero se limpió el ADNc usando la etapa de extracción de fenol/cloroformo y precipitación de etanol. Se resuspendió el agregado de ADNc en 30 µl de TE para uso en PCR.

Las reacciones de PCR se establecieron con cebadores degenerados en el extremo 5' de la región variable para la cadena pesada y ligera emparejados con cebadores 3' en la región constante. Por cada 50 µl de reacción se usó 1 µl de ADNc. Se ajustó la reacción según se dirigió para uso con PfuI seguido de 20 ciclos. Se comprobaron los productos de PCR ensayando 5 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 1%. Se clonaron las reacciones positivas usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen). Se secuenciaron las minipreparaciones de los clones positivos y se analizaron para redistribuciones de genes productivos. Los resultados de las reacciones de PCR y secuenciación independientes de clones múltiples revelaron las secuencias que se describen a continuación.

Secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 (CDR están en negrita).

E I V L T Q S P A T L S L S P G E
 1 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA
 CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCGGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT

CDR1

R A T L S C R A S Q S V S R Y L
 51 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC CGCTACTTAG
 TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCAGT CTCACAATCG GCGATGAATC

A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D
 101 CCTGGTACCA GCAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT
 GGACCATGGT CGTCTTTGGA CCGGTCCGAG GGTCCGAGGA GTAGATACTA

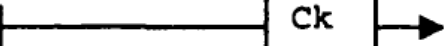
CDR2

A S N R A T G I P A R F S G S G S
 151 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC
 CGTAGGTTGT CCCGGTGACC GTAGGGTCGG TCCAAGTCAC CGTCACCCAG

G T D S T L T I S S L E P E D F
 201 TGGGACAGAC TCCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG
 ACCCTGTCTG AGGTGAGAGT GGTAGTCGTC GGATCTCGGA CTTCTAAAAC

CDR3

A V Y Y C Q Q R S N W P R T F G Q
 251 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GTCAAATAAT GACAGTCGTC GCATCGTTGA CCGGAGCCTG CAAGCCGGTT



G T K V E I K R T V A A P S V F I
 301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT
 CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCTTGACAC CGACGTGGTA GACAGAAGTA

F P
 351 CTTCCCG
 GAAGGGC

Secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 (CDR están en negrita, secuencia de señal en cursiva).

```

      M · K H   L W F F   L L L   V A A   P R W V
1  ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
   TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

      L S Q   V Q L   Q Q W G   A G L   L K P
51 CCTGTCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
   GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCCTGAC AACTTCGGAA

      S E T L   S L T   C A V   Y G G S   F S G
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCAGTGGT
   GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA

      CDR1

      Y · Y W   S W I R   Q P P   G K G   L E W I
151 TACTACTGGA GCTGGATCCG CCAGCCCCCA GGGAAGGGGC TGGAGTGGAT
   ATGATGACCT CGACCTAGGC GGTGCGGGGT CCCTTCCCCG ACCTCACCTA

      CDR2

      G · E I   N H S   G S T N   Y N P   S L K
201 TGGGGAAATC AATCATAGTG GAAGCACCAA CTACAACCCG TCCCTCAAGA
   ACCCCTTTAG TTAGTATCAC CTTCGTGGTT GATGTTGGGC AGGGAGTTCT

      S R V T   I S V   D T S   K N Q F   S L K
251 GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAA
   CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTT

      L · S S   V T A A   D T A   V Y Y   C A R G
301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGCGAGAGG
   GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CACATAATGA CACGCTCTCC

      CDR3

      Y Y D   I L T   G Y Y Y   Y F D   Y W G
351 GTATTACGAT ATTTTGA CTG GTTATTATTA CTACTTTGAC TACTGGGGCC
   CATAATGCTA TAAAACTGAC CAATAATAAT GATGAAACTG ATGACCCCGG

      CDR4

      Q G T L   V T V   S S A   S T K G   P S V
401 AGGGAACCCT GGTACCCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC
   TCCCTTGGGA CCAGTGGCAG AGGAGTCGGA GGTGGTTCCC GGGTAGCCAG

      F P L   A
451 TTCCCCCTGG CA
   AAGGGGGACC GT

```

Ejemplo 6: reactividad cruzada de especies de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b con TNFSF13b no humano

5 Con el fin de determinar la reactividad cruzada de especies del mAbs neutralizante, se estableció un ELISA que usa 4A5-3.1.1-B4 como el mAb de captura y detección. Se usó TNFSF13b recombinante humano como la curva estándar. Se pudo detectar TNFSF13b humano en el sobrenadante de cultivo en células CHO transfectadas con un vector que expresa hTNFSF13b, sobrenadantes de monocitos humanos cultivados o suero humano o plasma. Se

ensayaron los sobrenadantes en células de CHO que expresan TNFSF13b murino para reactividad en el ELISA y dieron negativo. 4A5-3.1.1-B4 fue también incapaz de inmunoprecipitar TNFSF13b murino pero fue capaz de inmunoprecipitar TNFSF13b humano. Se usó TNFSF13b murino en el ensayo de proliferación descrito en el ejemplo 2. Usando este ensayo de proliferación 4A5-3.1.1-B4 fue incapaz de neutralizar la proliferación inducida por TNFSF13b murino. Esto indica que 4A5-3.1.1-B4 es incapaz de reconocer TNFSF13b murino.

Ejemplo 7: secuencia de aminoácidos de cadena pesada 4A5-3.1.1-B4

A continuación está la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 de cadena pesada que comprende la HCVR y la región constante IgG4. La región constante IgG4 humana presenta una serina en la posición 231. Sin embargo esta posición en 231 fue sustituida de una serina a una prolina que introduce un cambio estructural en la región bisagra para obtener enlaces disulfuro de intercadenas óptimos. Esto reduce la generación de la mitad de los anticuerpos. La mitad de los anticuerpos se forman a partir de una cadena pesada y una cadena ligera.

```

1   QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
51  INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 DILTGYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201 TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
351 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV
401 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

```

Nº ID SEC: 17

Además se puede efectuar una sustitución de alanina por fenilalanina en la posición 237 y una sustitución de alanina o ácido glutámico por leucina en la posición 238 para disminuir la función del efector del anticuerpo.

Ejemplo 8: secuencia de aminoácidos de cadena pesada 4A5-3.1.1-B4

A continuación se da la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 de cadena pesada que comprende la región HCVR y la región constante IgG1.

```

1   QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
51  INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 DILTGYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
401 PFVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S
451 PGK

```

Nº ID SEC: 18

Ejemplo 9: secuencia de aminoácidos de 4A5-3.1.1-B4 de cadena ligera

A continuación se da la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 de cadena ligera que comprende la región LCVR y la región constante kappa.

```

1   EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
51  ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLNTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFN RGEC

```

Nº ID SEC: 19

Ejemplo 10: identificación del epítipo para 4A5-3.1.1-B4

Se determinó el epítipo al cual 4A5-3.1.1-B4 une y neutraliza TNFSF13b humano. Se alinearon secuencias de TNFSF13b humanas y murinas como se muestra a continuación:

Ratón	TNFSF13b	1	AFQGPETE	Q	DVDLSAPPAP	CLPGCRHSQH	DDNGMNLRLNI	IQDCLQLIA	49
Humano	TNFSF13b	1	AVQGP	EE---	-----	-----	-----	TV	TQDCLQLIA 18
Ratón	TNFSF13b	50	DSDTPTIRKG	TYTFVPWLLS	FKRGNALEEK	ENKIVVRQTG	YFFIYSQVLY	99	
Humano	TNFSF13b	19	DSETPTIQKG	SYTFVPWLLS	FKRGSALEEK	ENKILVKETG	YFFIYGQVLY	68	
Ratón	TNFSF13b	100	TDPIFAMGHV	IQRKKVHVFG	DELSLVTFLFR	CIQNMPKTLP	NNSCYSAGIA	149	
Humano	TNFSF13	69	TDKTYAMGHL	IQRKKVHVFG	DELSLVTFLFR	CIQNMPELTP	NNSCYSAGIA	118	
Ratón	TNFSF13b	150	RLEEGDEIQL	AIPRENAQIS	RNGDDTFFGA	LKLL	183		
Humano	TNFSF13b	119	KLEEGDELQL	AIPRENAQIS	LDGDVTFFGA	LKLL	152		

Se creó un modelo de homología para TNFSF13b humano basado en la estructura de cristal conocida para distintos miembros de la familia de TNF. Los residuos expuestos que son diferentes entre ratón y TNFSF13b humano son sitios de unión potenciales para 4A5-3.1.1-B4 ya que 4A5-3.1.1-B4 neutraliza TNFSF13b humano pero no de ratón.

Se identificaron tres epítipos potenciales: 1) K71, T72, Y73, E105; 2) Q26, S29, L139, D140; y 3) L53, K55, E56, K119. Se llevó a cabo la mutagénesis para preparar moléculas quiméricas cambiando la secuencia de aminoácido de humano a ratón. El químero A era L139R, D140N; químero B era K71P, T72I, Y73F; químero C era K71P, T72I, Y73F, E105K; químero D era L53V, K55R, E56Q; químero E era E105K.

Usando el ensayo de proliferación descrito en el ejemplo 2, se ensayaron todos los químeros en cuanto a la actividad funcional y neutralización con 4A5-3.1.1-B4. Se llevaron a cabo ensayos iniciales usando sobrenadantes de 293 transfectorias transitorias para cada uno de los químeros y ambas moléculas padre TNFSF13b humano y TNFSF13b murino. Todos los químeros indujeron proliferación similar lo que indica que los químeros producidos eran funcionales. Usando 6 ug/ml de 4A5-3.1.1-B4, se observó 100% de neutralización con TNFSF13b humano y químeros A, B, D y E. No se observó neutralización para TNFSF13b murino o químero C. Se produjeron mutantes de TNFSF13b purificados para químeros A, B, y C y se repitió el ensayo usando 11 ng/ml de cada uno de TNFSF13b o químero TNFSF 13b padre y 1 ug/ml de 4A5-3.1.1-B4. Los resultados mostraron que se observaba 100% de neutralización con TNFSF13b humano y químero A, 88% neutralización con químero B, y no se observaba neutralización para TNFSF13b murino o químero C.

Ejemplo 11: estudios in vivo que usan 4A5-3.1.1-B4

Se generan ratones transgénicos que sobreexpresan TNFSF13b humano soluble usando técnicas establecidas como se describe por parte de Hogan, B. y col. (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY] modificado por Fox y Solter (Mol. Cell. Biol. 8: 5470, 1988). Brevemente se microinyectó un fragmento de ADN que comprende el gen hTNFSF13b en el pronúcleo de macho de embriones en estado de una célula recién fertilizados (cigotos) de la cepa FVB/N. Se cultivaron los embriones *in vitro* durante la noche permitiendo el desarrollo de la fase de dos células. Se transplantaron luego los embriones de dos células en los oviductos de ratones de la familia DC-1 pseudoembarazados permitiendo que terminase el desarrollo. Para ensayar la presencia del transgén en el ratón recién nacido se retira un pequeño trozo del pie de cada animal y se digiere con proteinasa K para liberar los ácidos nucleicos. Se somete subsiguientemente una muestra de extracto del pie a análisis por PCR para identificar el ratón que contiene transgén.

Los ratones transgénicos con hTNFSF13b presentaban un aumento considerable en células B periféricas, por lo general aproximadamente tres veces en comparación con cachorros de la misma camada de igual edad y sexo. También hubo un ligero aumento en células T periféricas. Se trataron los ratones transgénicos hTNFSF13b con 4A5-3.1.1-B4 para determinar si la neutralización de hTNFSF13b resultaría en una reducción en número de células B de nuevo a niveles normales. Se inyectaron ratones hTNFSF13b hembra con 15 semanas de edad por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas bien con 25 ug de 4A5-3.1.1-B4 o anticuerpo de control con isótopo. Cuatro días después de la última inyección de anticuerpo se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazo para análisis. Se calcularon los niveles de células B y T determinado el porcentaje de células CD 19+, para células B, y células CD3+, para células T usando citometría de flujo y conteo de células sanguíneas blancas absolutas para cada bazo. Los resultados mostrados a continuación demuestran que la administración in vivo de 4A5-3.1.1-B4 a ratones

transgénicos con hTNFSF13b es capaz de restaurar los niveles normales de células T y B (media $\pm$ desviación estándar).

	Células B ($\times 10^6$)	Células T ($\times 10^6$)
Grupo de tratamiento		
Miembros de la misma camada de tipo salvaje	29 ± 11	46 ± 15
Transgénico + isotipo mAb	122 ± 30	75 ± 14
Transgénico + 4A5 mAb	29 ± 5	46 ± 12

Secuencias de la presente invención:

Nº ID SEC: 1 $\rightarrow$ secuencia de polinucleótido que codifica región variable de cadena ligera

**GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACT
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTAT
GATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT**

5

Nº ID SEC: 2 $\rightarrow$ secuencia de aminoácidos que codifica región variable de cadena ligera

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDST
LTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIKRT**

Nº ID SEC: 3 $\rightarrow$ secuencia de polinucleótido que codifica CDR1 de cadena ligera
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCC

10 Nº ID SEC: 4 $\rightarrow$ secuencia de aminoácido que codifica CDRI de cadena ligera RASQSVSRYLE

Nº ID SEC: 5 $\rightarrow$ secuencia de polinucleótido que codifica CDR2 de cadena ligera GATGCATCCAACAGGGCCACT

Nº ID SEC: 6 $\rightarrow$ secuencia de aminoácido que codifica CDR2 de cadena ligera DASNRAT

Nº ID SEC: 7 $\rightarrow$ secuencia de polinucleótido que codifica CDR3 de cadena ligera
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACG

15 Nº ID SEC: 8 $\rightarrow$ secuencia de aminoácido que codifica CDR3 de cadena ligera
QQRSNWPRT

Nº ID SEC: 9 $\rightarrow$ secuencia de polinucleótido que codifica región variable de cadena pesada

ATGAAA

**CACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTC
CCAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA
CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTAC
TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGA
AATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGC
TCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTA
CGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA**

Nº ID SEC: 10 → secuencia de aminoácido que codifica región variable de cadena pesada

**MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINH
SGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYFDYWGGTGLVTVSS**

**MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINH
SGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYFDYWGGTGLVTVSS**

5 N° ID SEC: 11 → secuencia de polinucleótido que codifica CDR1 de cadena pesada
GGTGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGC

N° ID SEC: 12 → secuencia de aminoácido que codifica CDR1 de cadena pesada GGSFSGYYWS

N° ID SEC: 13 → secuencia de polinucleótido que codifica CDR2 de cadena pesada
GAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGT

N° ID SEC: 14 → secuencia de aminoácido que codifica CDR2 de cadena pesada EINHSGSTNYNPSLKS

10 N° ID SEC: 15 → secuencia de polinucleótido que codifica CDR3 de cadena pesada
GGGTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTAC

N° ID SEC: 16 → secuencia de aminoácido que codifica CDR3 de cadena pesada GYYDILGTTTTFDY

Listado de secuencias

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTICUERPOS HUMANOS ANTI-Htrnfsf13B ANTAGONISTAS

5 <130> X-15239 PCT

<160> 16

<170> Patentin versión 3.1

10

<210> 1

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgctacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac tccactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaact	327

<210> 2

20

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr	
20 25 30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	

25

35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 3

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

agggccagtc agagtgttag ccgctactta gcc 33

10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

20

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 5

gatgcatcca acagggccac t 21

<210> 6

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

10 **Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr**
1 5

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 7

cagcagcgta gcaactggcc tcggacg 27

20 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 8

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 9

<211> 426

30 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> péptido sis

35 <222> (1)..(57)

<223>

<400> 9

atgaaacacc	tgtggttctt	cctcctcctg	gtggcagctc	ccagatgggt	cctgtcccag	60
gtgcaactac	agcagtgggg	cgcaggactg	ttgaagcctt	cggagaccct	gtccctcacc	120
tgcgctgtct	atgggtgggtc	cttcagtggg	tactactgga	gctggatccg	ccagccccca	180
gggaaggggc	tggagtggat	tggggaaatc	aatcatagt	gaagcaccaa	ctacaacccg	240
tccctcaaga	gtcgagtcac	catatcagta	gacacgtcca	agaaccagtt	ctccctgaaa	300
ctgagctctg	tgaccgccgc	ggacacgggt	gtgtattact	gtgcgagagg	gtattacgat	360
attttgactg	gttattatta	ctactttgac	tactggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	420
tcctca						426

5

<210> 10

<211> 142

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

15 <223>

<400> 10

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

<210> 11

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggtgggtcct tcagtggta ctactggagc

10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 12

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

ES 2 389 834 T3

<210> 13

<211> 48

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

gaaatcaatc atagtgaag caccaactac aaccggtccc tcaagagt 48

10 <210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 14

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15

20 <211> 45

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

25 gggattacg atatttgac tgggtattat tactacttg actac

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b que comprende:
 - a. Nº ID SEC: 4 localizada en CDR1 de la región variable de cadena ligera (LCVR);
 - b. Nº ID SEC: 6 localizada en CDR2 de la LCVR;
 - 5 c. Nº ID SEC: 8 localizada en CDR3 de la LCVR;
 - d. Nº ID SEC: 12 localizada en CDR1 de la región variable de cadena pesada (HCVR);
 - e. Nº ID SEC: 14 localizada en CDR2 de la HCVR; y
 - f. Nº ID SEC: 16 localizada en CDR3 de la HCVR
- 10 2. El anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de acuerdo con la invención 1 que comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) como se muestra en Nº ID SEC: 2 y un polipéptido de la región variable de cadena pesada (HCVR) como se muestra en Nº ID SEC: 10.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que el anticuerpo se disocia de un polipéptido TNFSF13b con KD de 1×10^{-8} M o inferior.
- 15 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el anticuerpo presenta una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior según se determina por resonancia de plasmones de superficie.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que el anticuerpo inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización in vitro con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o inferior.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5 en el que el anticuerpo presenta una CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6 en el que el anticuerpo presenta una CI_{50} de 1×10^{-10} M o inferior.
- 20 8. El anticuerpo de la reivindicación 7 en el que el anticuerpo presenta una CI_{50} de 1×10^{-11} M o inferior.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende una región constante de cadena pesada seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM y IgD.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9 en la que la región constante de cadena pesada es IgG1 o IgG4.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10 en la que la región constante de cadena pesada es IgG4.
- 25 12. El anticuerpo de la reivindicación 11 en la que el IgG4 presenta una prolina sustituido por serina en la posición 231.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende una región constante de cadena ligera kappa o lambda.
14. Un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b que se puede obtener de hibridoma depositado como ATCC PTA-3674.
- 30 15. El anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de acuerdo con la invención 1, o fragmento del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
 DILTGYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGPCCP PCPAPEFLGG PSVFLFPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LDSDG SFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGLK

y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD

ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTISSELEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLNTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

16. El anticuerpo humano anti-hTNFSF13b de acuerdo con la invención 1, o fragmento del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
 DILTGYYYYF DYWGQGTLLV TSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSIEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG
 PGK

5 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTISSELEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLNTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

17. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 16.

10 18. Un vector de expresión recombinante que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

19. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso como un medicamento.

15 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de cáncer.

23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes.

24. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide.

20 25. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

Figura 1

% de inhibición de proliferación de huTNFSF13b y IL-1 con 4A5-3.1.1-B4 CI_{50} = 76 ng/ml

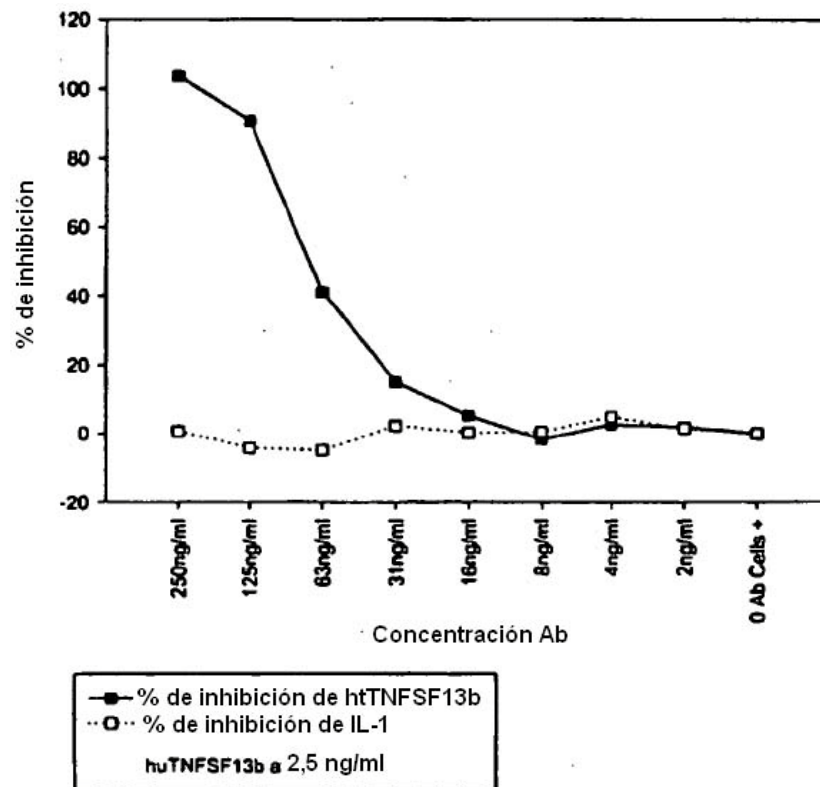


Figura 2

Neutralización de huTNFSF13b inducido con 4A5-3.1.1-B4 en células B primarias

