

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 990**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2002 E 10184675 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2348048**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b antagonistas**

30 Prioridad:

16.08.2001 US 312808 P

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

19.01.2015

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
RATHNACHALAMM, RADHAKRISHNAM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 526 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b antagonistas

5 Los ligandos de la familia de los TNF son conocidos por estar entre las citocinas más pleiotrópicas, induciendo un gran número de respuestas celulares, incluyendo proliferación, citotoxicidad, actividad anti-viral, actividades inmunoregulatoras y la regulación transcripcional de varios genes. La familia de citocinas y receptores de TNF 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, neutrocina- α y zTNF (para recapitulación 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 linfocitos B y a algunos linfocitos T.

15 Estudios de síndrome de choque séptico y otros trastornos que surgen de la sobreproducción de citocinas inflamatorias han mostrado que un huésped afectado contará frecuentemente con altos niveles de citocina liberando receptores de citocina solubles o sintetizando anticuerpos anti-citocina 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 citocina. Por tanto, hay una necesidad bien reconocida de anticuerpos humanos que se unan a citocinas, 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 citocina diana *in vitro* e *in vivo*. Si bien la solicitud de patente internacional WO 00/50597 divulga de forma no descriptiva anticuerpos dirigidos a TNFSF13b, tal solicitud no describe de forma específica las características estructurales o funcionales de tales anticuerpos.

20 Schneider P. y col., "AFF, A novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth", 1999, J. of Experimental Medicine, 189, 1747-1756) divulga un miembro de la familia de TNF, que se denomina BAFF que se expresa por linfocitos T y células dendríticas. El BAFF humano se usó para desarrollar anticuerpos monoclonales y policlonales.

25 El documento WO-A-98/18921 divulga las secuencias nucleotídica y de aminoácidos de TNSF13b (BAFF). Los anticuerpos contra BAFF también se divulgan.

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-hTNFSF13b. Los anticuerpos de la composición de acuerdo con 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 una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que comprende:

- a. un polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 4;
- 35 b. un polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6;
- c. un polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8;
- d. un polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12;
- e. un polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y
- f. un polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 16;
- 40 para usar en el tratamiento de artritis crónica juvenil, enfermedad de Crohn, soriasis, síndrome de Sjogren y linfomas o mielomas B o T.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende un anticuerpo que comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) como se muestra en SEC ID N.º: 2 y un polipéptido de región variable de cadena pesada (HCVR) como se muestra en SEC ID N.º: 10.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende el polipéptido:

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

y una cadena pesada que comprende el polipéptido:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFV GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
 DILTGYYYF DYWGQGLVLT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV
 LDSDGSEFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

5 Preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende un anticuerpo que se disocia a partir de un polipéptido TNFSF13b con K_D de 1×10^{-8} M o inferior.

Más preferiblemente, el anticuerpo tiene una CI_{50} de 1×10^{-8} M o inferior.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica en la que el anticuerpo tiene una CI_{50} de 1×10^{-11} M o inferior.

10 Preferiblemente, se proporciona una composición farmacéutica en la que anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD. Más preferiblemente, la región constante de cadena pesada de anticuerpo es IgG4.

En una realización más preferida de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica en la que el IgG4 del anticuerpo tiene una serina sustituida por prolina en la posición 231.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b aislado que se une a un polipéptido hTNFSF13b y se disocia del polipéptido hTNFSF13b con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o inferior, como se determina por resonancia de plasmones de superficie, o 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 tiene las siguientes características:

20 a) inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o inferior;

b) presenta una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 16; y

c) presenta una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 8.

25 La invención también proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones agudas o crónicas asociadas con actividad de linfocitos B y algunas linfocitos 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.

30 En otra realización, la presente invención proporciona secuencias que codifican los anticuerpos humanos novedosos 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 unen 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 de este modo la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones agudas o crónicas asociadas con actividad de linfocitos B y algunos linfocitos T incluyendo, pero sin limitarse a estas, trastornos autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y/o neoplasia.

La invención también comprende un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y un anticuerpo contenido dentro de dicho material de envasado, 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 es perjudicial y en el que el material de envasado comprende un encarte de envase que indica que el anticuerpo neutraliza mediante unión a 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 un encarte de envase que se proporciona para la administración de la forma farmacéutica que da lugar a la neutralización de la actividad de TNFSF13b.

Fig. 1. Gráfico que ilustra la inhibición de la proliferación inducida por hTNFSF13b e IL-1 de linfocitos 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 linfocitos B humanos primarios estimulados 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 constituida 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. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está constituida 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 constituida 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 constituida por una región variable de cadena ligera (de forma abreviada en esta invención como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementaridad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo 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.º: 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 divulgación 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 por citotoxicidad dependiente del complemento (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. Los anticuerpos humanos inyectados tienen una semivida esencialmente idéntica a la de los 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 de ligandos del factor de necrosis tumoral descrita en las solicitudes de patente internacional WO98/18921 y WO00/50597 (denominada en estos documentos como neutrocina-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 puedan preparar mediante procedimientos de expresión

recombinante convencionales o adquirirse comercialmente (Research Diagnostics Inc. número de catálogo: RDI-3113, rhuBAFF, Flanders, N.J.) así como también generarse sintéticamente.

La expresión "propiedad biológica", "característica biológica" y el término "actividad" en referencia a un anticuerpo de la presente invención se usan de forma intercambiable en esta invención e 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 ellas, 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 ser 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 expresión "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 ocupada con un aminoácido que establece contacto con el antígeno. Si un aminoácido CDR establece contacto con el antígeno, entonces ese aminoácido se puede considerar que ocupa una posición de contacto.

"Sustitución conservadora" o "sustitución de aminoácido conservadora" 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 divulgados en el presente documento.

El término "epítipo" tal como se usa en el presente documento 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.

La expresión "se 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 "se 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, imposibilitación, impedimento, restricción, ralentización, detención o inversión del progreso o gravedad de una enfermedad o afección.

El término "neutralización" o "antagonismo" en referencia a un anticuerpo anti-TNFSF13b o la expresión "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, impedimento inducido por TNFSF13b de apoptosis de linfocitos 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 linfocitos 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 o a 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 presenten diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNFSF13b sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de polipéptido hTNFSF13b).

La expresión “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 expresión “molécula de ácido nucleico aislada”, tal como se usa en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, HCVR, LCVR, CDR3) que se unen al polipéptido hTNFSF13b, incluye una molécula de ácido nucleico en la que las 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 se unen a antígenos distintos del polipéptido hTNFSF13b, pudiendo naturalmente dichas otras secuencias flanquear 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 codifiquen regiones HCVR que se unen a antígenos distintas del polipéptido 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 el presente documento como “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 una secuencia líder de secreción, contiguas y en fase 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 anticuerpos humanos combinatoria, 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 expresión “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 solo a la célula particular sino a la progenie de una célula tal. Debido a que pueden tener lugar ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debidas bien a la mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, 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, a mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de las relacionadas con secuencias HCVR y LCVR de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo 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 de la disposición de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tal ratón mutante en 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 presentación de fagos (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(1):86-95 (1991)).

“Recipiente” significa cualquier receptáculo y cierre adecuado para almacenamiento, expedición, dispensación 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, información y/o administración. El material de envasado puede mejorar la administración de anticuerpos al paciente, reducir o mejorar el tiempo de instrucción educativa 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.

“Encarte 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. El encarte de envase se refiere por lo general a la “etiqueta” de un producto farmacéutico.

Un “sujeto” significa un mamífero; preferiblemente un ser 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 es perjudicial, 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 inflamatoria del intestino, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad injerto contra huésped, rechazo a trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, esterilidad femenina, trombocitopenia autoinmune, enfermedad tiroidea autoinmune, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren y cánceres, en particular linfomas o mielomas de linfocitos 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 divulgan 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 SEC ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16 y que se une a epitopo de polipéptido TNFSF13b con alta afinidad, se disocia de un polipéptido TNFSF13b unido 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 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 SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de de la

HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y 3 polipéptido CDR de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 16. En otra realización, el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b comprende los polipéptidos de polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 4; polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6; polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8; polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12; polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 16.

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

En realizaciones preferidas, el anticuerpo humano aislado se disocia de un polipéptido 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 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 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 el presente documento como 4A5-3.1.1-B4. 4A5-3.1.1-B4 tiene secuencias de polipéptido en LCVR y HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 10, respectivamente. La secuencia de polinucleótidos que codifica la LCVR y HCVR de 4A5-3.1.1-B4 se muestra en SEC ID N.º: 1 y SEC ID N.º: 9, respectivamente. Las propiedades de los anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b de la presente invención se divulgan de forma específica en los ejemplos. Es particularmente notable la gran afinidad por polipéptido TNFSF13b, las cinéticas de disociación lentas y la gran capacidad para antagonizar la actividad de polipéptido TNFSF13b demostradas 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 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 producen 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 divulga en el presente documento.

Se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión en huésped para expresar los anticuerpos de la presente invención incluyendo sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, baculovíricos, de plantas y de mamíferos (así como también sistemas de expresión de exposición a fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19 (Sfi). Se conocen también en la técnica otros sistemas de expresión de anticuerpo y se contemplan en el presente documento.

Se puede preparar un anticuerpo de la invención mediante expresión recombinante de genes de cadenas ligeras y pesadas 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 ligeras y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo tal que las cadenas ligeras 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.

5 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 ADN de genes de región constante de cadena pesada se conocen 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 se describe en Kabat (Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º: 91-3242 (1991)), pero lo más preferiblemente es una región constante IgG1, o 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.

15 El ADN aislado que codifica la región LCVR se puede transformar en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también en 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.

20 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-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. EE.UU. 85:5879-5883 (1988); McCafferty y col, Nature 348:552-554 (1990)).

25 Para expresar los anticuerpos de la invención, ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos como se describió anteriormente, se insertan en vectores de expresión tales que los genes estén operativamente unidos a secuencias de control transcripcional y traduccional. El gen de anticuerpo está ligado en un vector tal que secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector sirven para su función pretendida de regulación de la transcripción y traducción 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 anticuerpos 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 romo si no hay presentes sitios de restricción). De forma adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido 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 de modo que el péptido señal esté unido en fase con el extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína distinta de inmunoglobulina).

30 Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Secuencias reguladoras comprenden promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras 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 reguladoras 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.

35 Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, 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, 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(n) 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 procariota o eucariota, 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 procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas y lo más preferiblemente en células huésped de mamífero, es lo más preferido debido a que tales células eucariotas y en particular las células de mamífero se ensamblan con mayor probabilidad que las células procariotas 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 de hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 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 vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la 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 están 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 puede usar también la tecnología del ADN recombinante para eliminar algunos o todos los ADN que codifican cualquiera o ambas de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para la unión a hTNFSF13b. Las moléculas expresadas a partir de 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 tanto la cadena pesada de anticuerpo como 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 reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un potenciador de CMV/elemento regulador del promotor AdMLP o un potenciador de SV40/elemento regulador del promotor AdMLP) para conducir a 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 se cultivan 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 expresen la porción de unión a 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 SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 12. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 16 (es decir, la CDR3 de HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Este ácido nucleico puede codificar solo 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 SEC ID N.º: 14 (es decir, la CDR2 de HCVR de 4A5-3.1.1-B4) y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 2 (es decir, la LCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1, si bien el experto en la técnica apreciará que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 SEC ID N.º: 10 (es decir, la HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 9, si bien el experto en la técnica apreciará que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 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 expertos 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, truncamientos, 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 mejorada(s) o reducida(s), como sea deseable) actividad(es) que los anticuerpos descritos en esta invención. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene 3 sustituciones o menos conservadoras. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene 2 sustituciones o menos sustituciones conservadoras. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene una sustitución conservadora. El experto en la técnica reconocerá que anticuerpos que tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras 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 tiosfato (kit de Amersham Sculptor). Se muestran en la tabla 1 sustituciones conservadoras de interés junto con sustituciones preferidas.

Tabla 1. Sustituciones conservadoras

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

(continuación)

Residuo	Sustituciones	Sustitución preferida
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, 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)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ala, Ile, Leu, Met, Ser, Met, Norleucina	Leu

5 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 SEC ID N.º: 2, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 4, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 6, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 8, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 10, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 12, un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 14; y un polipéptido como se muestra en SEC ID N.º: 16.

10 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 tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10; y

b) una cadena ligera de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2.

15 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 el 90 al 95 % de homogeneidad y lo más
20 preferido del 98 al 99 % o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos se pueden usar terapéutica o profilácticamente, como se indica en el presente documento.

25 Los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. De forma típica, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un diluyente, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado y se usan de forma apropiada diluyentes, vehículo, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares.

30 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 mediante supositorios.

35 Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Se prefiere administración sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal

o subcutánea. Vehículos adecuados para tales inyecciones son simples. Adicionalmente, no obstante, se puede efectuar la administración por las membranas de la mucosa por medio de aerosoles nasales o supositorios. Formulaciones adecuadas para tales modos de administración se conocen bien e incluyen de forma típica tensioactivos que facilitan la transferencia a través de la membrana.

- 5 Las composiciones farmacéuticas deben ser de forma típica estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar por filtración tras fabricación de la formulación, o se pueden preparar de otra forma microbiológicamente aceptable. Una composición 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 pueden 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, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar. El pH de la formulación se seleccionará para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y la confortabilidad del paciente cuando se administra. Por lo general, se tolera bien el pH entre 6 y 8.

20 El TNFSF13b juega un papel crítico en la patología asociada con una diversidad 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 es perjudicial, 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 inflamatoria del intestino, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo a transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con transplante de órganos, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, esterilidad femenina, trombocitopenia autoinmune, enfermedad del tiroides autoinmune, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren y cánceres, en particular linfomas o mielomas de linfocitos 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.

30 Se contempla también en el presente documento 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 es perjudicial.

35 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 dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando por tanto posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Se apreciará por el experto 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 por el uso de terapia de combinación que, en cambio, permite el uso de una dosis inferior del anticuerpo para conseguir el efecto terapéutico deseado).

40 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 cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o de parte del anticuerpo son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva a dosificaciones y durante 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.

50 Se pueden ajustar pautas de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo simple, varias dosis divididas se pueden administrar a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

55 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 un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (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

bien el anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para detectar de este modo hTNFSF13b en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado 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 adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, 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 ²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

De forma alternativa para marcar el anticuerpo se puede ensayar TNFSF13b en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición que usa patrones de TNFSF13b marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo humano anti-hTNFSF13b no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de TNFSF13b marcados y el anticuerpo humano anti-hTNFSF13b se combinan y se determina la cantidad de patrón de TNFSF13b marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de TNFSF13b en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rTNFSF13b marcado 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. Para 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	RKKVHVFGE	LSLVTLFRCI	QNMPETLPNN	SCYSAGIAKL	120
	121	EEGDELQLAI	PRENAQISLD	GDVTFFGALK	LL	152

Los aminoácidos de hTNFSF13b implicados en la unión de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b novedosos comprenden 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 novedosos 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 pero no limiten la invención.

Ejemplo 1. generación de anticuerpos monoclonales humanos anti-hTNFSF13b

Se generaron anticuerpos monoclonales usando la tecnología HuMAb-Mouse™ de Medarex inmunizando los ratones con hTNFSF13b soluble (aminoácidos 133-285, adquiridos de 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. Se inyectaron ocho ratones que producen títulos de anticuerpo en suero para hTNFSF13b por vía i.v. con 10 µg de hTNFSF13b en PBS. Se recogieron los bazo tres días más tarde de cada ratón y se condensaron con células de mieloma de acuerdo con el procedimiento descrito por Zola (Zola, H. Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Boca Ratón, FL. (1987)).

Se ensayaron hibridomas para unión a hTNFSF13b y se aseguró que se expresaran en cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas. Se detectó unión del anticuerpo a hTNFSF13b mediante ELISA como sigue:

- 10 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 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 añadieron por pocillo 100 µl de reactivos secundarios diluidos (HRP-HuIgGf, Jackson número de catálogo: 109-036-098 o HRP-HuKappa, Bethyl número de catálogo 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 hulG y cadena ligera kappa humana kappa se seleccionaron para la subclonación.
- 20 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 Sefarosa (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 nivel 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 las fracciones que contenían anticuerpos y se concentraron usando una unidad de filtro centrífugo Ultrafree (Millipore, corte de peso molecular en 10 kDa).
- 25

Ejemplo 2: actividad funcional de anticuerpos humanos anti-hTNFSF13b

Se midió la actividad neutralizante de los anticuerpos humanos 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 x 10⁻⁵ M y penicilina, estreptomina 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 sembraron en placa con 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se incluyeron los sobrenadantes de hibridomas positivos de ELISA a una dilución 1:4. Se añadieron 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 ninguna evidencia de inhibición de proliferación estimulada con IL-1, solo la proliferación estimulada con hTNFSF13b.

- 40 Se ensayaron los anticuerpos neutralizantes en relación a la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos B humanos primarios aumentados con TNFSF13b en respuesta a la estimulación con anti-IgM. Se aislaron los linfocitos B humanos primarios de sangre humana usando selección positiva de CD19 usando el sistema de aislamiento magnético MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se añadieron los linfocitos B a pocillos de una placa de 96 pocillos a 2 x 10⁵ linfocitos por pocillo en RPMI completo que contenía FCS al 10 % (RPMI completo es RPMI 1640 que contiene L-glutamina 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y β-mercaptoetanol 1 x 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 algunos de los linfocitos 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.
- 50

Ejemplo 3: caracterización de anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos anti-hTNFSF13b neutralizantes eran bien IgG1 humana o bien IgG4 humana. 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 transferido sobre nitrocelulosa. Todos los anticuerpos neutralizantes fallaron en unirse a hTNFSF13b en una prueba de transferencia de western 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 recubrió 4A5-3.1.1-B4 sobre un chip

seguido de inyección de hTNFSF13b y luego de una cantidad saturadora de un anticuerpo no neutralizante. Una vez se alcanzó la saturación, se dispuso una concentración elevada de 4A5-3.1.1-B4 sobre el chip. Once de los anticuerpos monoclonales no neutralizantes eran incapaces de competir por 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 el 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, podía competir por 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 pueden 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. El 4A5-3.1.1-B4 se unió a 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 proteínas a una HPLC de exclusión por tamaño (dos, columnas TosoHaas TSK-GEL G3000PW en tándem) equilibrada en PBS a un caudal de 0,25 ml/min. Se eluyeron las proteínas con PBS. Como controles, se analizaron soluciones de anticuerpos y la solución de hTNFSF13b se analizó por separado. TNFSF13b humano eluyó desde la columna de exclusión por 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 alteración en la concentración proteica de moléculas que interactúan en una matriz de biosensor de dextrano. Salvo cuando se indique, todos los reactivos y materiales se adquirieron de 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 tensoactivo 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 un chip con sensor CM5 usando el kit de acoplamiento de amina. Se inmovilizó IgG anti-humano de cabra (específico de Fc; Jackson ImmunoResearch) en célula de flujo 2 también por acoplamiento de amina. Ambos anticuerpos se inmovilizaron para llegar a 700 unidades de respuesta cada uno.

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 $\mu\text{l}/\text{min}$. y consistió en las siguientes etapas: inyección de 150 μl de 4A5-3.1.1-B4 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inyección de 250 μl de hTNFSF13b (partiendo a 50 nM y usando diluciones en serie 2 veces para cada ciclo) seguidas en 15 minutos por 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 a antígeno de cadenas pesadas y ligeras

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 a partir de 2×10^6 células de hibridoma usando el protocolo Micro-Fast Track (Invitrogen) suministrado con el kit. Se preparó ADNc a partir de 200 μl de precipitado en etanol de ARNm usando kit de ciclo de ADNc (Invitrogen) mediante centrifugación de la alícuota de ARNm durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C seguida por lavado del sedimento con etanol al 70 %. Se resuspendió el sedimento secado al 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 con fenol/cloroformo y la precipitación de etanol. Se resuspendió el sedimento de ADNc en 30 μl de TE para usar en PCR.

Las reacciones de PCR se establecieron con cebadores degenerados en el extremo 5' de la región variable para las cadenas pesadas y ligeras emparejados con cebadores 3' en la región constante. Por cada 50 μl de reacción, se usó 1 μl de ADNc. Se estableció la reacción como dirigida para uso con PfuI seguido por 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 independientes y secuenciación de clones múltiples revelaron las secuencias que se describen a continuación.

5 Secuencias de cadena ligera de anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 (las 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 AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC
     CGTAGGTTGT CCCGGTGACC GTAGGGTCCG 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 CTTCTAAAC

                                     CDR3

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

                                     Ck →

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

· F P
351 CTTCCCG
     GAAGGGC

```

Secuencias de cadena pesada de anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 (las CDR están en negrita, secuencia señal está 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  CCTGTCCCAG 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 GGTCTGGGGT 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 ATTTTGACTG GTTATTATTA CTACTTTGAC TACTGGGGCC
   CATAATGCTA TAAACTGAC CAATAATAAT GATGAAACTG ATGACCCCGG

      CDR4

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

      F P L   A
451 TTCCCCCTGG CA
   AAGGGGGACC GT

```

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

5 Con el fin de determinar la reactividad cruzada entre especies de los mAb neutralizantes, 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 a partir de células CHO transfectadas con un vector que expresa hTNFSF13b, sobrenadantes de monocitos humanos cultivados o suero humano o plasma. Se ensayaron los sobrenadantes de células de CHO que expresan TNFSF13b murino para reactividad en el

ELISA y dieron negativo. El 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.

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

A continuación está la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 de la 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 se sustituyó de una serina a una prolina que introduce un cambio estructural en la región bisagra para obtener enlaces disulfuro intercatenarios 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 TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
351 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTFPV
401 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK
    
```

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

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

15 A continuación está la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 de la 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 KPSNTKVDK K VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
401 PFLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S
451  PGK
    
```

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

20 A continuación está 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 STLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLNTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201  LSSPVTKSFN RGEK
    
```

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

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

Ratón	TNFSF13b	1	AFQGPETEEO	DVDLSAPPAP	CLPGCRHSQH	DDNGMNLARNI	IQDCLQLIA	49
Humano	TNFSF13b	1	AVQGPEE---	-----	-----	-----	-----TV	TQDCLQLIA 18
Ratón	TNFSF13b	50	DSDTPTIRKG	TYTFVPWLLS	FKRGNALEEK	ENKIVVRQTG	YFFIYSQVLY	99
Humano	TNFSF13b	19	DSETPTIQKG	SYTFVPWLLS	FKRGSALEEK	ENKILVKETG	YFFIYQVLY	68
Ratón	TNFSF13b	100	TDPIFAMGHV	IQRKRVHVPF	DELSLVTLFR	CIQNMPKTLF	NNSCYSAGIA	149
Humano	TNFSF13	69	TDKTYAMGHL	IQRKRVHVPF	DELSLVTLFR	CIQNMPETLP	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 cristalina conocida para varios miembros de la familia de TNF. Los residuos expuestos que son diferentes entre TNFSF13b de 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 epítomos potenciales: 1) K71, T72, Y73, E105; 2) Q26, S29, L139, D140; y 3) L53, K55, E56, K119. Se llevó a cabo mutagénesis para preparar moléculas quiméricas cambiando la secuencia de aminoácidos de humano a ratón. La quimera A era L139R, D140N; la quimera B era K71P, T72I, Y73F; la quimera C era K71P, T72I, Y73F, E105K; la quimera D era L53V, K55R, E56Q; la quimera E era E105K.

Usando el ensayo de proliferación descrito en el ejemplo 2, se ensayaron todas las quimeras en cuanto a la actividad funcional y la neutralización con 4A5-3.1.1-B4. Se llevaron a cabo ensayos iniciales usando sobrenadantes de 293 transfectorias transitorias para cada una de las quimeras y para ambas moléculas parentales TNFSF13b humano y TNFSF13b murino. Todas las quimeras indujeron proliferación similar lo que indica que las quimeras producidas eran funcionales. Usando 6 µg/ml de 4A5-3.1.1-B4, se observó el 100 % de neutralización con TNFSF13b humano y con quimeras A, B, D y E. No se observó neutralización para TNFSF13b murino o quimera C. Se produjeron mutantes de TNFSF13b purificados para quimeras A, B y C y se repitió el ensayo usando 11 ng/ml de cada uno de los TNFSF13b parentales o de cada quimera de TNFSF13b y 1 µg/ml de 4A5-3.1.1-B4. Los resultados mostraron que se observaba el 100 % de neutralización con TNFSF13b humano y con quimera A, el 88 % de neutralización con quimera B y que no se observaba neutralización para TNFSF13b murino o para quimera 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 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 masculino de embriones en estado de una célula (cigotos) recién fertilizados 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 ratonas de la cepa CD-1 pseudoembarazadas para permitirles desarrollarse hasta el final. Para ensayar la presencia del transgén en el ratón recién nacido, se retira un pequeño trozo del dedo de la pata de cada animal y se digiere con proteinasa K para liberar los ácidos nucleicos. Se somete subsiguientemente una muestra de extracto del dedo de la pata a análisis por PCR para identificar el ratón que contiene el transgén.

Los ratones transgénicos con hTNFSF13b tenían un aumento considerable en linfocitos B periféricos, por lo general aproximadamente tres veces en comparación con hermanos de camada de igual edad y sexo. También hubo un ligero aumento en linfocitos T periféricos. Se trataron los ratones transgénicos hTNFSF13b con 4A5-3.1.1-B4 para determinar si la neutralización de hTNFSF13b resultaría en una reducción en los números de linfocitos B de nuevo a niveles normales. A las 15 semanas de edad, se inyectaron ratones hTNFSF13b hembra por vía subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas bien con 25 µg de 4A5-3.1.1-B4 o bien con anticuerpo control de isotipo. Cuatro días después de la última inyección de anticuerpo, se sacrificaron los ratones y se retiraron los bazos para análisis. Se calcularon los números de linfocitos B y T determinando el porcentaje de células CD19+, para linfocitos B y células CD3+, para linfocitos T usando citometría de flujo y recuento de leucocitos absolutos para cada bazo. Los resultados se muestran 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 linfocitos T y B (media ± desviación estándar).

	Linfocitos B (x10 ⁶)	Linfocitos T (x10 ⁶)
Grupo de tratamiento		
Miembros de la misma camada de tipo natural	29 ± 11	46 ± 15
Transgénico + mAb isotipo	122 ± 30	75 ± 14

(continuación)

	Linfocitos B (x10 ⁶)	Linfocitos T (x10 ⁶)
Grupo de tratamiento		
Transgénico + 4A5 mAb	29 ± 5	46 ± 12

Secuencias de la presente invención:

SEC ID N.º: 1 → secuencia polinucleotídica que codifica región variable de cadena ligera

**GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACT
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT**

5 SEC ID N.º: 2 → secuencia de aminoácidos que codifica región variable de cadena ligera

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDST
LTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIKRT**

SEC ID N.º: 3 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR1 de cadena ligera

AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCC

SEC ID N.º: 4 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR1 de cadena ligera

10 RASQSVSRYLE

SEC ID N.º: 5 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR2 de cadena ligera

GATGCATCCAACAGGGCCACT

SEC ID N.º: 6 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR2 de cadena ligera

DASNRAT

15 SEC ID N.º: 7 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR3 de cadena ligera

CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACG

SEC ID N.º: 8 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR3 de cadena ligera

QQRSNWPRT

SEC ID N.º: 9 → secuencia polinucleotídica que codifica región variable de cadena pesada

**CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA
CCCTGTCCCTCACCTGCGTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTAC
TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGA
AATCAATCATAGTGGAAAGCACC AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGC
TCTGTGACCGCCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTA
CGATATTTTACTGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA**

20

SEC ID N.º: 10 → secuencia de aminoácidos que codifica región variable de cadena pesada

**QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVD
TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYFDYWGQGLVTVSS**

SEC ID N.º: 11 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR1 de cadena pesada

GGTGGTCCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGC

ES 2 526 990 T3

SEC ID N.º: 12 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR1 de cadena pesada

GGSFSGYYWS

SEC ID N.º: 13 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR2 de cadena pesada

GAAATCAATCATAGTGGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGT

5 SEC ID N.º: 14 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR2 de cadena pesada

EINHSGSTNYNPSLKS

SEC ID N.º: 15 → secuencia polinucleotídica que codifica CDR3 de cadena pesada

GGGTATTACGATATTTTGACTGGTTATTACTACTTTGACTAC

SEC ID N.º: 16 → secuencia de aminoácidos que codifica CDR3 de cadena pesada

10 GYYDILTGTTTTFDY

SEC ID N.º: 17 → secuencia de aminoácidos que codifica cadena ligera

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS
GTDSTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSENTLTLKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N.º: 18 → secuencia de aminoácidos que codifica cadena pesada

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

15 **Listado de secuencias**

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTICUERPOS HUMANOS ANTI-hTNFSF13B ANTAGONISTAS

<130> X15239 PCT

<160> 18

20 <170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

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

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <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
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

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

agggccagtc agagtgttag ccgctactta gcc 33

<210> 4

15 <211> 11

<212> PRT

<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

<400> 5

gatgcatcca acagggccac t 21

5 <210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

10

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 7

cagcagcgta gcaactggcc tcggacg 27

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 9

<211> 369

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

caggtgcaac tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aaactgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag agggattac 300

gatattttga ctggttatta ttactacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

ES 2 526 990 T3

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 10

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 11

ggtgggtcct tcagtggtta ctactggagc 30

<210> 12

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

20 <211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaaatcaatc atagtgaag caccaactac aaccgtccc tcaagagt 48

5 <210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15

<211> 45

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 15

gggtattacg atatttgac tgggtattat tactacttg actac 45

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17

<211> 214

25 <212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> construcción sintética

<400> 17

ES 2 526 990 T3

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
 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 Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 18

<211> 450

<212> PRT

5 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> construcción sintética

<400> 18

ES 2 526 990 T3

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

ES 2 526 990 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly Lys
 450

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que comprende:
- a. un polipéptido CDR1 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 4;
 - b. un polipéptido CDR2 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 6;
 - 5 c. un polipéptido CDR3 de la LCVR como se muestra en SEC ID N.º: 8;
 - d. un polipéptido CDR1 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 12;
 - e. un polipéptido CDR2 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 14; y
 - f. un polipéptido CDR3 de la HCVR como se muestra en SEC ID N.º: 16;
- 10 para usar en el tratamiento de artritis crónica juvenil, enfermedad de Crohn, soriasis, síndrome de Sjogren y linfomas o mielomas B o T.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el anticuerpo comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) como se muestra en SEC ID N.º: 2 y un polipéptido de región variable de cadena pesada (HCVR) como se muestra en SEC ID N.º: 10.

15 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende el polipéptido:

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD

ASNRRATGIPA RFSGSGSGTD STLTISSELEP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLNLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEK
    
```

y una cadena pesada que comprende el polipéptido:

```

QVQLQQWAGG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYSWIRQP PGKGLEWIGE
INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
DILTGYYF DYWGQGLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
LDSDGGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGLK
    
```

20 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el anticuerpo se disocia de un polipéptido TNFSF13b con K_D de 1×10^{-8} M o inferior.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que el anticuerpo tiene una CI_{50} de 1×10^{-8} M o inferior.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 en la que el anticuerpo tiene una CI_{50} de 1×10^{-11} o inferior.

25 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 en la que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es IgG4.

30 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la IgG4 del anticuerpo tiene una serina sustituida por prolina en la posición 231.

Figura 1/2

% de inhibición de proliferación de huTNFSF13b e IL-1 con 4A5-3.1.1-B4

CI₅₀ = 76 ng/ml

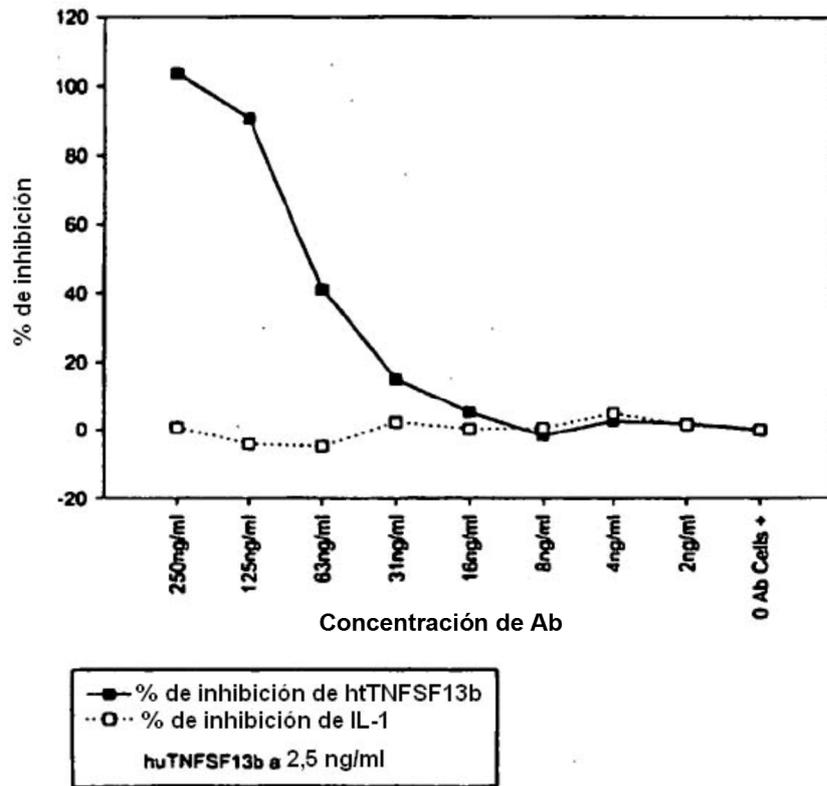


Figura 2/2

Neutralización de proliferación inducida por huTNFSF13b con 4A5-3.1.1-B4 en linfocitos B primarios

