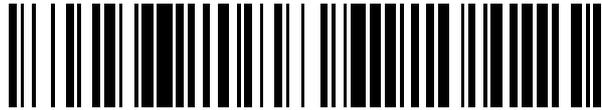


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 738**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2004 E 04754321 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 1631313**

54 Título: **Terapia de combinación para trastornos de células B**

30 Prioridad:

**05.06.2003 US 476481 P**

**05.06.2003 US 476414 P**

**06.06.2003 US 476531 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**

**1 DNA WAY**

**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**CHAN, ANDREW;**

**GONG, QIAN y**

**MARTIN, FLAVIUS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 537 738 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

Terapia de combinación para trastornos de células B

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevas terapias de combinación para el tratamiento de tumores malignos de células B así como trastornos autoinmunitarios

10 **Antecedentes de la invención**

Los linfocitos son una de varias poblaciones de glóbulos blancos; reconocen específicamente y responden a antígeno ajeno. Las tres clases principales de linfocitos son linfocitos B (células B), linfocitos T (células T) y células citolíticas naturales (NK). Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos y proporcionan inmunidad humoral. Los linfocitos B maduran dentro de la médula ósea y dejan la médula expresando un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B virgen se encuentra por primera vez con el antígeno para el que su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula comienza a dividirse rápidamente y su descendencia se diferencia en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una esperanza de vida más larga y continúan expresando un anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen anticuerpos unido a membrana sino que producen en su lugar una forma secretada del anticuerpo. Los anticuerpos secretados son las moléculas efectoras principales de la inmunidad humoral.

El antígeno CD20 (también denominado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humano, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en linfocitos pre-B y B maduros (Valentine *et al.* J. Biol. Chem. 264(19): 11282-11287 (1989); y Einfeld *et al.* EMBO J. 7(3): 711-717 (1988)). El antígeno también se expresa en más del 90 % de linfomas no de Hodgkin (NHL) de células B (Anderson *et al.* Blood 63(6): 1424-1433 (1984)), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder *et al.* J. Immunol. 135(2): 973-979 (1985)). Se cree que CD20 regula una etapa o etapas tempranas en el proceso de activación para el inicio y diferenciación del ciclo celular (Tedder *et al.*, mencionado anteriormente) y posiblemente actúe como un canal de ión de calcio (Tedder *et al.* J. Cell. Biochem. 14D: 195 (1990)).

Dada la expresión de CD20 en linfomas de células B, este antígeno ha sido una diana terapéutica útil para tratar dichos linfomas. Hay más de 300.000 personas en los Estados Unidos con NHL de células B y se diagnostican cada año más de 56.000 nuevos casos. Por ejemplo, el anticuerpo rituximab (RITUXAN®) que es un anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico modificado por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 humano (disponible en el mercado de Genentech, Inc., South San Francisco, California, Estados Unidos) se usa para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin de células B, CD20 positivo, recidivante o refractario de grado bajo o folicular. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la Patente de Estados Unidos Nº 5.736.137 presentada el 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*). El mecanismo *in vitro* de estudios de acción ha demostrado que RITUXAN® se une con el complemento humano y lisa líneas celulares B linfoides mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Reff *et al.* Blood 83(2): 435-445 (1994)). Adicionalmente, tiene actividad significativa en ensayos para citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Los estudios preclínicos *in vivo* ha mostrado que RITUXAN® agota las células B de la sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea de monos cynomolgus, supuestamente mediante procesos mediados por célula y complemento (CDC) (Reff *et al.* Blood 83(2): 435-445 (1994)). Otros anticuerpos anti-CD20 indicados para el tratamiento de NHL incluyen el anticuerpo murino Zevalin™ que se une con el radioisótopo. El Itrio-90 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA), Bexxar™ que es otro anticuerpo completamente murino conjugado con I-131 (Corixa, WA).

BLyS (también conocido como BAFF, TALL-1, THANK, TNFSF13B o zTNF4) es un miembro de la superfamilia del ligando TNF1 que es esencial para la supervivencia y maduración de las células B. La sobreexpresión de BLyS en ratones transgénicos conduce a hiperplasia de células B y desarrollo de enfermedad autoinmunitaria grave (Mackay, *et al.* (1999) J. Exp. Med. 190, 1697-1710; Gross, *et al.* (2000) Nature 404, 995-999; Khare, *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97,3370-33752-4). Los niveles de BLyS están elevados en pacientes humanos con diversos trastornos autoinmunitarios, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y síndrome de Sjögren (Cheema, G. S., *et al.*, (2001) Arthritis Rheum. 44, 1313-1319; Groom, J., *et al.*, (2002) J. Clin. Invest. 109, 59-68; Zhang, J., *et al.*, (2001) J. Immunol. 166, 6-10). Además, los niveles de BLyS se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, lo que sugiere que BLyS puede desempeñar un papel directo en la patogénesis de estas enfermedades. BLyS actúa en las células B uniéndose con tres miembros de la superfamilia del receptor de TNF, TACI, BCMA y BR3 (también conocido como BAFF-R) (Gross, *et al.*, mencionado anteriormente; 8. Thompson, J. S., *et al.*, (2001) Science 293, 2108-2111; Yan, M., *et al.*, (2001) Curr. Biol. 11, 1547-1552; Yan, M., *et al.*, (2000) Nat. Immunol. 1, 37-41; Schiemann, B., *et al.*, (2001) Science 293, 2111-2114). De los tres, solamente BR3 es específico para BLyS; los otros dos también se unen con el miembro de la familia de TNF relacionado, APRIL. La comparación de los fenotipos de BLyS y ratones con anulación del receptor o mutantes indica que la señalización a través de BR3 media en las funciones de supervivencia de células B de BLyS (Thompson, *et al.*, mencionado anteriormente; Yan,

(2002), mencionado anteriormente; Schiemann, mencionado anteriormente). Por el contrario, TACI parece actuar como un receptor inhibitor (Yan, M., (2001) Nat. Immunol. 2, 638-643), mientras que el papel de BCMA no está claro (Schiemann, mencionado anteriormente).

5 BR3 es una proteína transmembrana de tipo III de 184 restos expresada en la superficie de células B (Thompson, *et al.*, mencionado anteriormente; Yan, (2002), mencionado anteriormente). La región intracelular no porta ninguna similitud de secuencia con dominios estructurales conocidos o motivos de interacción proteína-proteína. No obstante, la señalización inducida por BLyS a través de BR3 da como resultado el procesamiento del factor de transcripción NF-B2/p100 a p52 (Claudio, E, *et al.*, (2002) Nat. Immunol. 3, 958-965; Kayagaki, N., *et al.*, (2002) Immunity 10,515-524). El dominio extracelular (ECD) de BR3 también es divergente. Los miembros de la familia de TNFR se caracterizan habitualmente por la presencia de múltiples dominios ricos en cisteína (CRD) en su región extracelular; cada CRD está compuesto normalmente de ~40 restos estabilizados por seis cisteínas en tres enlaces disulfuro. Los miembros convencionales de esta familia realizan contactos con el ligando a través de dos CRD que interaccionan con dos zonas distintas en la superficie del ligando (revisado en Bodmer, J.-L., *et al.*, (2002) Trends Biochem. Sci. 27, 19-26). Sin embargo, el ECD de BR3 contiene solamente cuatro restos de cisteína, capaces de formar un CRD parcial como máximo, planteando la cuestión de cómo un receptor tan pequeño transmite unión de ligando de alta afinidad.

20 Previamente se ha mostrado que el dominio de unión de BLyS de BR3 reside dentro una región central de 26 restos (Kayagaki, *et al.*, mencionado anteriormente). Seis restos de BR3, cuando se estructuran dentro un péptido en horquilla  $\beta$  (bhpBR3), fueron suficientes para conferir unión a BLyS y bloquear la señalización mediada por BR3. Otros han presentado polipéptidos que se ha propuesto que interaccionan con BLyS (por ejemplo, documentos WO 02/24909, WO 03/035846, WO 02/16312, WO02/02641).

## 25 Sumario de la invención

La invención proporciona un método para agotar células B de una población mixta de células de acuerdo con la reivindicación 1. Este método es útil por ejemplo, en un ensayo *in vitro* comercial para agotar eficaz y selectivamente células B de una población mixta de células, poniendo en contacto las células B con un antagonista de BLyS y un anticuerpo anti-CD20. Otra realización del método precedente de agotamiento de células B es agotar específicamente ciertos subconjuntos de células B tales como células B de un centro germinal y células B de zona marginal. Las células B de centro germinal desveladas en el presente documento pueden estar en el bazo y placas de Peyer. Se desvela en el presente documento un método para agotar todos los subconjuntos de células B *in vitro* o *in vivo* poniendo en contacto las células B con un antagonista de BLyS y un anticuerpo de unión a CD20.

35 La invención también proporciona un método para agotar todas las poblaciones de células B en el bazo administrando a un mamífero, un antagonista de BLyS y anticuerpo anti-CD20 en cantidades eficaces para agotar todas las poblaciones de células B. En una realización específica, el método es eficaz para agotar las células B de zona marginal y centro germinal en el bazo, ganglio linfático y placas de Peyer.

40 Se desvela en el presente documento un método para tratar una neoplasia de células B o tumor maligno caracterizado por células B que expresan CD20, que comprende administrar a un paciente que padece la neoplasia o el tumor maligno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 y un antagonista de BLyS. El anticuerpo de unión a CD20 y antagonista de BLyS pueden administrarse simultáneamente. El anticuerpo de unión a CD20 y antagonista de BLyS pueden administrarse secuencialmente. El antagonista de BLyS puede administrarse antes que el anticuerpo de unión a CD20. La neoplasia de células B puede ser linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL linfocítico pequeño (SL), enfermedad de Hodgkin de linfocitos predominantes (LPHD), linfomas de células de centro folicular (FCC), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia por tricoleucitos. En este método de tratamiento, BR3-Fc y Rituxan se administran a dosificaciones desveladas en la sección de Dosificación. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de CD20 pueden administrarse junto con quimioterapia.

55 Se desvela en el presente documento un método para aliviar un trastorno autoinmunitario regulado por células B que comprende administrar a un paciente que padece el trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 y de un antagonista de BLyS. El trastorno autoinmunitario puede seleccionarse del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren y glomerulonefritis. Cuando el trastorno autoinmunitario es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, el antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 pueden administrarse junto con terapia usando un fármaco seleccionado de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides, prednisona y fármaco antirreumático modificador de enfermedad (ARME).

65 En cualquiera de los métodos de tratamiento o alivio de un trastorno en el que se administra anticuerpo de unión a CD20 y antagonista de BLyS a un paciente, el anticuerpo de unión a CD20 y el antagonista de BLyS pueden

administrarse simultánea o secuencialmente. El antagonista de BLYS puede administrarse antes que el anticuerpo de unión a CD20.

5 Una composición que comprende un anticuerpo de unión a CD20 y un antagonista de BLYS también se desvela en el presente documento.

Se desvela en el presente documento un artículo de fabricación que comprende anticuerpo de unión a CD20, un antagonista de BLYS, y una etiqueta, en el que la etiqueta indica que la composición es para tratar una neoplasia de células B o un trastorno autoinmunitario regulado por células B.

10 El anticuerpo anti-CD20 puede incluir anticuerpo quimérico y humanizado. Las realizaciones específicas del anticuerpo anti-CD20 incluyen rituximab (RITUXAN®), m2H7 (2H7 murino), hu2H7 (2H7 humanizado) y todas sus variantes funcionales, hu2H7.v16 (v significa versión), v31, v96, v114, v115, que tienen las secuencias de aminoácidos. hu2H7.v16 intacto tiene la secuencia de cadena L madura de SEC ID N°: 15 y cadena H de SEC ID N°: 16.

15 El antagonista de BLYS, puede ser una inmunoadhesina. En realizaciones específicas, la inmunoadhesina se selecciona del grupo que consiste en inmunoadhesina BR3 que comprende el dominio extracelular de BR3, inmunoadhesina TACI que comprende el dominio extracelular de TACI, e inmunoadhesina BCMA que comprende el dominio extracelular de BCMA. En otras realizaciones, el antagonista de BLYS es un anticuerpo anti-BLYS, en particular, un anticuerpo anti-BLYS que se une con BLYS dentro de una región de BLYS que comprende los restos 162-275. En otra realización, el antagonista de BLYS es un anticuerpo anti-BR3 incluyendo uno que se une con BR3 en una región que comprende restos 23-38 de BR3 humano. Las posiciones de aminoácidos de BR3 humano indicadas en las reivindicaciones son de acuerdo con la numeración de secuencias en BR3 humano o BR3 humano alternativo desvelado en el presente documento bajo la definición de "BR3".

20 En realizaciones específicas el antagonista de BLYS se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de 17 unidades que tiene la secuencia de ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCSEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N° 8), o ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9) así como formas PEGiladas de estos polipéptidos de 17 unidades:

un polipéptido que tiene la secuencia de

35 **MLPGCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLPGCKWDLLIKQWVCD  
PLGGGGGVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWWDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 10):**

inmunoadhesina hBR3-Fc que tiene la secuencia de

40 **MSALLILALVGAAVASTRGRSLRGRDAPAPTPCVAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASS  
PAPRTALQPQESQVTDKAAHYTLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 2).**

En cualquiera de los métodos precedentes de la invención, en una realización el antagonista de BLYS y el anticuerpo anti-CD20 actúan de forma sinérgica para agotar las células B

45 **Breve descripción de las figuras**

Las Figuras 1A-1B muestran una secuencia polinucleotídica que codifica un TACI humano de secuencia nativa (SEC ID N°: \_) y su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: \_).

50 La Figura 2 muestra una secuencia polinucleotídica que codifica un BCMA humano de secuencia nativa (SEC ID N°: \_) y su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: \_).

La Figura 3 muestra una secuencia polinucleotídica que codifica un BLYS humano de secuencia nativa (SEC ID N°:   ) y su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:   ).

Las Figuras 4A-4B muestran una secuencia polinucleotídica que codifica un APRIL humano de secuencia nativa (SEC ID N°:   ) y su secuencia de aminoácidos potencial (SEC ID N°:   ).

La Figura 5A muestra una secuencia polinucleotídica (los codones de inicio y terminación están subrayados) que codifica TACI humanos de secuencia nativa (SEC ID N°:   ) y la Figura 5B muestra su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:   ).

La Figura 6A muestra una secuencia polinucleotídica (los codones de inicio y terminación están subrayados) que codifica un BR3 humano de secuencia nativa (SEC ID N°:   ) y la Figura 6B muestra su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:   ); la Figura 6C muestra una secuencia polinucleotídica (los codones de inicio y terminación están subrayados) que codifica BR3 murino (SEC ID N°:   ), y la Figura 9A muestra su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:   ).

Las Figuras 7A-7B muestran métodos ejemplares para calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada "Proteína de Comparación" con la secuencia de aminoácidos designada "PRO". Para fines del presente documento, la secuencia "PRO" puede ser las secuencias TACI, BCMA, TALL-1, APRIL, TACI o BR3 indicadas en las Figuras en el presente documento.

La Figura 8 muestra un alineamiento de dos secuencias de aminoácidos para el receptor TACI, denominado "hTACI (265)" (SEC ID N°:   ), que se cree que es una variante de corte y empalme, y "hTACI", también indicado en las Figuras 1A-1B (SEC ID N°:   ).

La Figura 9 muestra un alineamiento de secuencias de BR3 humano (SEC ID N°:   ) y murino (SEC ID N°:   ) con aminoácidos indicados por letra y aminoácidos conservados indicados por una señal más debajo.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de CD20 humano que muestra regiones transmembrana (encuadradas) y extracelulares (subrayadas) predichas. Los dominios potenciales son 1-63: Citoplasmático; 64-84: Transmembrana; 85-105: Transmembrana; 106-120: Citoplasmático; 121-141: Transmembrana; 142-188: Extracelular; 189-209: Transmembrana; 210-297: Citoplasmático; 81-167: enlace disulfuro.

La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos para CD20 humano.

La Figura 12 es un alineamiento de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) de 2H7 murino (SEC ID N°   ), variante de 2H7 v16 humanizada (SEC ID N°   ), y un subgrupo de cadena ligera kappa humana I (SEC ID N°   ). Las CDR de  $V_L$  de 2H7 y hu2H7.v16 son las siguientes: CDR1 (SEC ID N°   ), CDR2 (SEC ID N°   ) y CDR3 (SEC ID N°   ).

La FIG. 13 es un alineamiento de secuencias que compara las secuencias  $V_H$  de de 2H7 murino (SEC ID N°   ), variante de 2H7 v16 humanizada (SEC ID N°   ), y la secuencia consenso humana del subgrupo de cadena pesada III (SEC ID N°   ). Las CDR de  $V_H$  de 2H7 y hu2H7.v16 son las siguientes: CDR1 (SEC ID N°   ), CDR2 (SEC ID N°   ) y CDR3 (SEC ID N°   ).

En la FIG. 12 y la FIG. 13, las CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena están incluida entre paréntesis, flanqueadas por las regiones marco conservadas, FR1-FR4, como se indica. Los asteriscos entre dos filas de secuencias indican las posiciones que son diferentes entre las dos secuencias. La numeración de restos es de acuerdo con Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), con inserciones mostradas como a, b, c, d y e.

La Figura 14 muestra la expresión del transgén de CD20 humano en células B220<sup>+</sup> de ratón (células B) de ratones hCD20 BAC Tg<sup>+</sup>.

La Figura 15 muestra la expresión de CD20 durante la maduración de células B en ratones hCD20 BAC Tg. En las Figuras 15-19, la línea roja muestra el control negativo, la tinción de células de compañeros de camada transgén negativos (Tg<sup>-</sup>) con un mAAb anti-hCD20. La línea verde muestra la tinción con respecto a CD20 humano en ratones Tg<sup>+</sup>. Los ratones Tg<sup>+</sup> se refieren a ratones transgénicos hC20 BAC.

La Figura 16 muestra representaciones de FACS que demuestran la expresión de CD20 humano en las células B de diferentes estadios de maduración/diferenciación (maduro, pre-B y B inmaduro, pro-B y B progenitor) en médula ósea de ratón Tg<sup>+</sup>.

La Figura 17 muestra representaciones de FACS que demuestran la expresión de CD20 humano en células B esplénicas de ratón Tg<sup>+</sup>. Las células se seleccionaron en B220<sup>+</sup> para obtener células B. IgM y CD21 permiten la delimitación en los diversos subconjuntos de células B de T2/folicular, zona marginal y T1.

La Figura 18 muestra representaciones de FACS que demuestran la expresión de CD20 humano en ganglios linfáticos mesentéricos de ratón Tg<sup>+</sup> (LN).

5 La Figura 19 muestra representaciones de FACS que demuestran la expresión de CD20 humano en placas de Peyer de ratón Tg<sup>+</sup>. Las células se seleccionaron con respecto a B220<sup>+</sup>. El marcador de CD38 distingue las células B maduras de las de centro germinal.

10 La Figura 20 perfila estudios sobre los efectos del mAb anti-hCD20 en ratones CD20 humano Tg<sup>+</sup>. Se inyectó a los ratones 1,0 mg [equivalente a 50 mg/kg] de anticuerpo anti-CD20 el día 0 (flecha negra encima de la línea horizontal) y las células se analizaron en los días indicados por flechas rojas debajo de la línea horizontal. Se realizaron análisis de FACS en sangre periférica, bazo, ganglio linfático, médula ósea, y placas de Peyer. Se controlaron los niveles en suero de mAb anti-hCD20.

15 La Figura 21 muestra representaciones de FACS que demuestran el agotamiento de células B de sangre periférica con mAb anti-hCD20. El panel izquierdo muestra el control de IgG, es decir, animales tratados con anticuerpo de isotipo coincidente, no específico.

20 La Figura 22 muestra representaciones de FACS que demuestran el agotamiento de células B de LN periféricas maduras por mAb anti-hCD20 en el panel derecho. El panel izquierdo muestra el control de IgG, es decir, animales tratados con anticuerpo de isotipo coincidente, no específico. CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> selecciona todas las células B.

25 La Figura 23 muestra representaciones de FACS que demuestran el agotamiento de células B T2 esplénicas, pero no células B de zona marginal, por mAb anti-hCD20.

30 La Figura 24 muestra representaciones de FACS que demuestran el agotamiento de células B maduras en recirculación, pero no células inmaduras/pre-B o pro-B por mAb anti-hCD20. El rojo representa ratones tratados con IgG mientras que el verde representa tratados con mAb anti-hCD20 que expresan el hCD20. Los ratones tratados con IgG (rojo) conservaron células B maduras que expresaban hCD20, mientras que mAb anti-hCD20 agotó las células portadoras de hCD20. La expresión de CD20 humano se controló con respecto a detección de CD20 tanto no unido como unido a Ab.

35 La Figura 25 muestra representaciones de FACS que demuestran la resistencia de las células B del centro germinal de placas de Peyer a mAb anti-hCD20. El panel izquierdo muestra células de los ratones tratados con IgG de control. El panel derecho muestra células de los ratones Tg<sup>+</sup> tratados con mAb anti-CD20.

40 La Figura 26 muestra representaciones de FACS que demuestran el agotamiento y recuperación de células B en sangre periférica después del tratamiento de los ratones Tg<sup>+</sup> con mAb anti-hCD20. Los paneles de la fila superior muestran tinción de células de ratones tratados con mAb de control. Se administró a los ratones anticuerpo el día 1. Con el tiempo, las células B precursoras que no expresan hCD20 se desarrollan a células B maduras CD20<sup>+</sup> (véase tinción en la semana 6 y 14).

45 La Figura 27 muestra representaciones de FACS que demuestran la resistencia de células B de centro germinal esplénico a tratamiento con mAb anti-CD20 a corto plazo (inyección individual). El día 8 después de la inmunización de glóbulos rojos de oveja para inducir la formación de centros germinales, se trató un grupo de ratones con el mAb m2H7 para CD20 humano. El conjunto de ratones de control se trató con anticuerpo de control de isotipo mIgG2a. Las células del bazo de los ratones se analizaron el día 12. PNA (aglutinina de cacahuete) tiñe el centro germinal. No se detectó agotamiento de células B de centro germinal con tratamiento anti-CD20.

50 La Figura 28 muestra representaciones de FACS que demuestran que las células B de zona marginal (MZ) y B1 no agotadas confieren protección a antígenos independientes de T. En los 3 paneles a la derecha, las células del bazo se tiñeron con respecto al polisacárido-fosfatidil colina de estreptococos (el antígeno TI). CD138 es un marcador para células plasmáticas.

55 La Figura 29 muestra los efectos biológicos distintos de la combinación de un antagonista de BLyS, BR3-Fc, y mAb anti-CD20, m2H7, tratamiento en un modelo animal como se describe en el Ejemplo 4. Se realizó análisis de FACS en células B del bazo, sangre, ganglio linfático (seleccionadas en CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>). La terapia de combinación claramente produjo un efecto sinérgico en el agotamiento de células B, y especialmente células B de zona marginal, T2 y foliculares en el bazo.

60 La Figura 30 muestra los efectos sinérgicos en el agotamiento de células B de la combinación de mAb anti-hCD20 y BR3-Fc en los ratones CD20 Tg<sup>+</sup>, como se describe en el Ejemplo 4. Los ratones se trataron con IgG<sub>2a</sub> de control, BAFFR/BR3-Fc (100 µg/ratón IP diario durante 12 días), mAb anti-hCD20 (100 µg/ratón IP el día 9) o la combinación de BAFFR/BR3-Fc y mAb anti-hCD20 (misma dosificación como grupos de tratamiento individuales). Se aislaron esplenocitos B220<sup>+</sup> el día 13 y se tiñeron con respecto a CD21 y CD23. N = 5

ratones/grupo.

La Figura 31 muestra la cuantificación del agotamiento de células B del bazo totales B220+ (todos los subconjuntos de MZ + FO + T1 + T2), células B de zona marginal (MZ) y foliculares (FO) de ratones hCD20 Tg+ como se describe en el Ejemplo 4 y la Fig. 30 excepto que los ratones se trataron con dosis individuales de 0,1 mg de IgG<sub>2a</sub> de control, BAFFR/BR3-Fc o mAb anti-hCD20. Los esplenocitos se analizaron el día 4. N = 5 ratones/grupo.

Las Figuras 32A-C muestran la secuencia de aminoácidos de 17 unidades seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos para unión de BLYS de alta afinidad.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Aunque el tratamiento de MAb anti-CD20 agota ciertos subconjuntos de células B, se ha observado previamente que se conservan las células B de zona marginal, células B de centro germinal y células plasmáticas. Por el contrario, el bloqueo de las señales de supervivencia de células B con BR3-Fc también agota células B o modula los números de células B, pero en diferente magnitud. Se cree que BR3 afecta a la supervivencia de todas las células B. Se ha descubierto a partir de los experimentos descritos en el presente documento que la administración de una combinación de anticuerpo anti-CD20 con un antagonista de BLYS produjo resultados sorprendentemente sinérgicos en agotamiento de células B *in vivo*. La combinación de anticuerpo anti-CD20 y terapias dirigidas contra la ruta de BLYS proporciona un nuevo método para tratar enfermedades mediadas por células B incluyendo tumores malignos basados en células B y trastornos autoinmunitarios regulados por células B. La terapia de combinación de anticuerpo anti-CD20 con antagonista de BLYS puede ofrecer alternativas eficaces y menos tóxicas a tratamientos existentes para ciertas enfermedades, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL).

Una "enfermedad autoinmunitaria" en el presente documento es una enfermedad o trastorno no maligno que surge de y se dirige contra los propios (auto) antígenos y/o tejidos del individuo.

Como se usa en el presente documento, "agotamiento de células B" se refiere a una reducción en los niveles de células B en un animal o ser humano después de tratamiento farmacológico o de anticuerpos, en comparación con el nivel antes del tratamiento. Los niveles de células B pueden medirse usando ensayos bien conocidos tales como obtener un recuento de sangre completo, por tinción de análisis de FACS para marcadores de células B conocidos, y por métodos tales como los descritos en los Ejemplos Experimentales. El agotamiento de células B puede ser parcial o completo. En una realización, el agotamiento de células B que expresan CD20 es de al menos el 25 %. En un paciente que recibe un fármaco que agota células B, las células B generalmente se agotan durante el tiempo en que el fármaco está en circulación en el cuerpo del paciente y el tiempo de recuperación de células B.

El antígeno "CD20" es una fosfoproteína transmembrana no glucosilada con un peso molecular de aproximadamente 35 kD que se encuentra en la superficie de más del 90% de células B de sangre periférica u órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo de células pre-B y permanece hasta la diferenciación de células plasmáticas; no se encuentra en células madre humanas, células progenitoras linfoides o células plasmáticas normales. CD20 está presente tanto en células B normales como en células B malignas. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen "antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 que se describe, por ejemplo, en Clark y Ledbetter, *Adv. Can. Res.* 52: 81-149 (1989) y Valentine *et al.* *J. Biol. Chem.* 264(19): 11282-11287 (1989).

El anticuerpo de unión a CD20 y anticuerpo anti-CD20 se usan de forma intercambiable en el presente documento y abarcan todos los anticuerpos que se unen con CD20 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico en la dirección a una célula que expresa el antígeno, y no reacciona de forma cruzada significativamente con otras proteínas tales como una proteína de control negativo en los ensayos descritos posteriormente. También se contemplan anticuerpos biespecíficos en los que una rama del anticuerpo se une con CD20. También están abarcados por la presente definición de anticuerpo de unión a CD20 fragmentos funcionales de los anticuerpos precedentes. El anticuerpo de unión a CD20 se unirá con CD20 con una Kd de < 10 nM. En realizaciones preferidas, la unión es una Kd de < 7,5 nM, más preferentemente < 5 nM, aún más preferentemente entre 1-5 nM, más preferentemente < 1 nM.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen con el antígeno CD20 incluyen: "C2B8" que se denomina ahora "Rituximab" ("RITUXAN®") (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] designado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); IgG2a murino "B1", también denominado "Tositumomab" (Beckman Coulter) opcionalmente marcado con <sup>131</sup>I para generar el anticuerpo "131I-B1" (yodo I131 tositumomab, BEXXAR™) (Patente de Estados Unidos N° 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.* *Blood* 69(2): 584-591 (1987) y variantes del mismo incluyendo "con parches marco conservados" o 1F5 humanizado (documento WO03/002607, Leung, S.); depósito de ATCC HB-96450); 2H7 murino y anticuerpo 2H7 quimérico (Patente de Estados Unidos N° 5.677.180); 2H7 humanizado; huMax-CD20 (Genmab, Dinamarca); AME-133 (Applied Molecular Evolution); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como el

anticuerpo A20 quimérico humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (documento US 2003/0219433, Immunomedics); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, en: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))).

Los términos "rituximab" o "RITUXAN®" en el presente documento se refieren al anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico obtenido por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 y designado "C2B8" en la Patente de Estados Unidos N° 5.736.137, incluyendo fragmentos del mismo que conservan la capacidad para unirse con CD20.

En una realización específica, los anticuerpos anti-CD20 se unen con CD20 humano y de primate. En realizaciones específicas, los anticuerpos que se unen con CD20 son humanizados o quiméricos. Los anticuerpos que se unen a CD20 incluyen rituximab (RITUXAN®), m2H7 (2H7 murino), hu2H7 (2H7 humanizado) y todas sus variantes funcionales, incluyendo sin limitación, hu2H7.v16 (v significa versión), v31, v73, v75, así como variantes deficientes en fucosa. Las secuencias de algunos de los anticuerpos de variante hu2H7 se proporcionan a continuación, siendo las secuencias N-terminal en negrita la secuencia líder que se retira en el polipéptido maduro:

hu2H7.v16 cadena L [232 aa] (SEC ID N° 3)

**MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGK  
APKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDSTYLSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

hu2H7.v16 cadena H [471 aa] (SEC ID N° 4)

**MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAP  
GKGLEWVGAIIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVY  
YSNSYWFYFDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE  
PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

hu2H7.v31 cadena H [471 aa] SEC ID N° 11:

**MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAP  
GKGLEWVGAIIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVY  
YSNSYWFYFDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE  
PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

La cadena L de v31 es la misma que la de v16 anterior, es decir, SEC ID N° 3.

Únicamente para los fines del presente documento, "2H7v.16 humanizado" se refiere a un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena ligera variable:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR**  
(SEC ID N°: 13); y

secuencia de cadena variable:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIIYPGNGDTSYNQKF  
KGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTTLVTVSS**  
(SEC ID N°: 14).

Cuando el anticuerpo 2H7v.16 humanizado es un anticuerpo intacto, preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera v16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSG  
 TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N° 15); y

secuencia de aminoácidos de cadena pesada v16

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYPGNGDTSYNQKF  
 KGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVWGQGLVTVSSASTKGP  
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP  
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEC ID N°: 16).

10 La región V de todas las otras variantes basadas en la versión 16 tendrán las secuencias de aminoácidos de v16 excepto en las posiciones de sustituciones de aminoácidos que se indican en la tabla a continuación. A no ser que se indique de otro modo, las variantes 2H7 tendrán la misma cadena L que la de v16.

Versión de 2H7	Cambios de cadena pesada (V <sub>H</sub> )	Cambios de cadena ligera (V <sub>L</sub> )	Cambios de Fc
31	-	-	S298A, E333A, K334A (SEC ID N° 17)
96	D56A, N100A	S92A (SEC ID N° 18)	
114	D56A, N100A	M32L, S92A (SEC ID N° 19)	S298A, E333A, K334A (SEC ID N° 20)
115	D56A, N100A	M32L, S92A (SEC ID N° 21)	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L (SEC ID N° 22)

15 Una variante del mAb 2H7 humanizado precedente es 2H7v.31 que tiene la misma secuencia de cadena L que SEC ID N°: 15 anterior, con la secuencia de aminoácidos de cadena H:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTSYNMHWVRQAP  
 KGLEWVGA IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVY  
 YNSYWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID

N°: 17)

20 El anticuerpo murino anti-CD20 humano, m2H7, tiene la secuencia VH:

QAYLQOSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSY  
 NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVYYSNSYWYFDVWGVTGTTVTV  
 S (SEC ID N°: 23)

25 Y secuencia VL:

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYAPSNLASGVPAR  
 FSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCOOWSFNPPFTFGAGTKLELK (SEC ID N°: 24)

30 A no ser que se indique, las secuencias desveladas en el presente documento del 2H7v.16 humanizado y variantes del mismo son del polipéptido maduro, es decir, sin la secuencia líder.

35 Las patentes y publicaciones de patente que se refieren a los anticuerpos de CD20 incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 5.776.456, 5.736.137, 5.843.439, 6.399.061 y 6.682.734, así como las solicitudes de patente de Estados Unidos N° US 2002/0197255A1, US 2003/0021781A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1 (Anderson *et al.*); Patente de Estados Unidos N° 6.455.043B y documento WO00/09160 (Grillo-

Lopez, A.); documentos WO00/27428 (Grillo-López y White); WO00/27433 (Grillo-López y Leonard); WO00/44788 (Braslowsky *et al.*); WO01/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter y White); WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); US2001/0018041A1, US2003/0180292A1, WO01/34194 (Hanna y Hariharan); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0006404 y documento WO02/04021 (Hanna y Hariharan); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0012665 A1 y documento WO01/74388 (Hanna, N.); Solicitud de Estados Unidos N° US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); Solicitud de Estados Unidos N° 2003/0103971 A1 (Hariharan y Hanna); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0009444A1, y documento WO01/80884 (Grillo-López, A.); documento WO01/97858 (White, C.); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0128488A1 y documento WO02/34790 (Reff, M.); documentos WO02/060955 (Braslowsky *et al.*); WO2/096948 (Braslowsky *et al.*); WO02/079255 (Reff y Davies); Patente de Estados Unidos N° 6.171.586B1, y documento WO98/56418 (Lam *et al.*); documentos WO98/58964 (Raju, S.); WO99/22764 (Raju, S.); WO99/51642, Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, Patente de Estados Unidos N° 6.242.195B1, Patente de Estados Unidos N° 6.528.624B1 y Patente de Estados Unidos N° 6.538.124 (Idusogie *et al.*); documentos WO00/42072 (Presta, L.); WO00/67796 (Curd *et al.*); WO01/03734 (Grillo-López *et al.*); Solicitud de Estados Unidos N° US 2002/0004587A1 y documento WO01/77342 (Miller y Presta); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0197256 (Grewal, I.); Solicitud de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); Patentes de Estados Unidos N° 6.565.827B1, 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398 y 5.595.721, (Kaminski *et al.*); Patentes de Estados Unidos N° 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108, 6.120.767, 6.652.852B1 (Robinson *et al.*); Patente de Estados Unidos N° 6.410.391B1 (Raubitschek *et al.*); Patente de Estados Unidos N° 6.224.866B y documento WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); documentos WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO00/67795 (Goldenberg); Solicitud de Estados Unidos N° US 2003/0133930 A1 y documento WO00/74718 (Goldenberg y Hansen); documentos WO00/76542 (Golay *et al.*); WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); Patente de Estados Unidos N° 6.368.596B 1 (Ghetie *et al.*); Patente de Estados Unidos N° 6.306.393 y Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); Solicitud de Estados Unidos N° US2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann); documento WO02/102312 (Engleman, E.); Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0068664 (Albitar *et al.*); documento WO03/002607 (Leung, S.); documentos WO 03/049694, US2002/0009427A1, y US 2003/0185796 A1 (Wolin *et al.*); WO03/061694 (Sing y Siegall); US 2003/0219818 A1 (Bohen *et al.*); US 2003/0219433 A1 y WO 03/068821 (Hansen *et al.*); US2003/0219818A1 (Bohen *et al.*); US2002/0136719A1 (Shenoy *et al.*); WO2004/032828 (Wahl *et al.*). Véase también Patente de Estados Unidos N° 5.849.898 y solicitud EP N° 330.191 (Seed *et al.*); Patente de Estados Unidos N° 4.861.579 y documentos EP332.865A2 (Meyer y Weiss); USP 4.861.579 (Meyer *et al.*); WO95/03770 (Bhat *et al.*); US 2003/0219433 A1 (Hansen *et al.*).

Los anticuerpos de CD20 pueden ser anticuerpos desnudos o conjugados con un compuesto citotóxico tal como un radioisótopo o una toxina. Dichos anticuerpos incluyen el anticuerpo Zevalin™ que se une con el radioisótopo, Itrio-90 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA) y Bexxar™ que se conjuga con I-131 (Corixa, WA). Las variantes de 2H7 humanizadas incluyen las que tienen sustituciones de aminoácidos en la FR y variantes de maduración de afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en la CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo donante o aceptor. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD20 de la invención comprenden además cambios en restos de aminoácidos en la región Fc que conducen a función efectora mejorada incluyendo función CDC y/o ADCC potenciada y destrucción de células B (también denominada en el presente documento agotamiento de células B). En particular, se han identificado tres mutaciones para mejorar la actividad CDC y ADCC: S298A/E333A/K334A (también denominado en el presente documento un mutante o variante de triple Ala; la numeración en la región Fc es de acuerdo con el sistema de numeración de EU; Kabat *et al.*, mencionado anteriormente) como se ha descrito (Idusogie *et al.*, mencionado anteriormente (2001); Shields *et al.*, mencionado anteriormente).

Otros anticuerpos anti-CD20 de la invención incluyen los que tienen los cambios específicos que mejoran la estabilidad. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 quimérico tiene regiones V murinas y región C humana. Uno de dichos anticuerpos anti-CD20 quimérico específico es Rituxan® (Rituximab®; Genentech, Inc.). Rituximab y hu2H7 puede mediar en la lisis de células B tanto mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) como mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Se describen variantes de anticuerpo con secuencias de aminoácidos de región Fc alterada y capacidad de unión a Clq aumentada o reducida en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes polipeptídicas con unión mejorada o reducida a FcR: Véase, también, Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

El sitio de glucosilación N en IgG está en Asn297 en el dominio CH2. Se incluyen en el presente documento anticuerpos de unión a CD20 humanizados que tienen una región Fc, en los que aproximadamente el 80-100 % (y preferentemente aproximadamente el 90-99 %) del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidratos central madura que carece de fucosa, unida con la región Fc de la glucoproteína. Dichos anticuerpos muestran mejora en la unión con FcγRIIIA(F158), que no es tan eficaz como FcγRIIIA (V158) en la interacción con IgG humano.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos monocatenarios y

fragmentos de anticuerpos. De acuerdo con algunas realizaciones, un polipéptido se fusiona en un marco de anticuerpo, por ejemplo, en la región variable o en una CDR de modo que el anticuerpo pueda unirse con e inhibir la unión de BLYS con BR3 o la señalización de BLYS. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido de la presente invención pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido pueden ser un fragmento de anticuerpo. Dichos anticuerpos y métodos para generarlos se describen en más detalle posteriormente. Como alternativa, un anticuerpo de la presente invención puede producirse inmunizando un animal con un polipéptido. Por lo tanto, se contempla un anticuerpo dirigido contra un polipéptido desvelado en el presente documento.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítotos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, que no está contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos quiméricos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservadas importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR son normalmente no más de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PREMATIZED<sup>®</sup> en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando macacos con el antígeno de interés. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos humanizados.

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

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de unión a CD20 de la invención son los fragmentos que conservan la unión con CD20 sustancialmente con la misma afinidad que la molécula de cadena completa intacta de la que

derivan y son capaces de agotar células B como se mide por ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como los descritos en el presente documento.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión con Clq y citotoxicidad dependiente de complemento; unión con el receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células independiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo células Citolíticas Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y se requieren absolutamente para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, células NK, expresan solamente FcγRIII mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Citolíticas Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (Clq) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen con su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996),

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas u otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se preparará anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

Las expresiones "BLYS", "polipéptido BLYS", "TALL-1" o "polipéptido TALL-1", "BAFF" cuando se usan en el presente documento abarcan "polipéptidos de BLYS de secuencia nativa" y "variantes de BLYS". "BLYS" es una designación que se da a los polipéptidos que están codificados por una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación:

Secuencia de BLYS humana (Fig. 3; SEC ID N°   )

1 mddstereqs rltscikkre emklkecvsi lprkespsvr sskdglklaa tlllallsc  
61 ltvvsfyqva alqgdlslr aelqghhaek lpagagapka gleeapavta glkifepap  
121 gegnssqnsr nkravqgpee tvtdclqli adsetptiqk gsytfvpwll sfkragsalee  
181 kenkilvket gyffiygqvl ytdktyamgh liqrkkvhvf gdelslvtlf rciqnmpetl  
241 pnnscysagi akleegdelq laiprenaqi slgdvtffg alkll

50

Secuencia de BLYS de ratón (SEC ID N°   )

1 mdesaktlpp pclcfsekg edmkvgydpi tpqkeegawf gicrdgrlla atllalls  
 61 sftamslyql aalqadlmnl rmelqsyrqs atpaaagape ltagvkltp aaprphnssr  
 121 ghrnrafqg peeteqdvdl sappapclpg crhsqhddng mnlrniqdc lqliadsdtp  
 181 tirkgytyfv pwllsfkrngn aleekenkiv vrtqgyffiy sqvlytdpif amghviqrkk  
 241 vhfvgdelsl vtlfrciqnm pklpnnsy sagiarleeg deiqlaire naqisrngdd  
 301 tffgalkll

5 y en la Figura 3 y homólogos y fragmentos y variantes de los mismos, que tienen la actividad biológica del BLYS de  
 secuencia nativa. Una actividad biológica de BLYS puede seleccionarse del grupo que consiste en promoción de la  
 supervivencia de células B, promoción de la maduración de células B y unión con BR3. Las variantes de BLYS  
 tendrán preferentemente al menos 80 % o cualquier número entero sucesivo hasta 100 %, incluyendo, más  
 preferentemente, al menos 90 %, y aún más preferentemente, al menos 95 % de identidad de secuencia  
 10 aminoácidos con una secuencia nativa de un polipéptido BLYS. Un polipéptido BLYS de "secuencia nativa"  
 comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido BLYS correspondiente  
 derivado de la naturaleza. Por ejemplo, BLYS existe en una forma soluble después de escisión de la superficie  
 celular por proteasas de tipo furina. Dichos polipéptidos BLYS de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza  
 o pueden producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "polipéptido BLYS de secuencia nativa"  
 15 abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio  
 extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes  
 alélicas de origen natural del polipéptido. El término "BLYS" incluye los polipéptidos descritos en Shu *et al.*, J.  
 Leukocyte Biol., 65: 680 (1999); N° de referencia de GenBank AF136293; documento WO98/18921 publicado el 7 de  
 mayo de 1998; documento EP 869.180 publicado el 7 de octubre de 1998; documento WO98/27114 publicado el 25  
 20 de junio de 1998; documento WO99/12964 publicado el 18 de marzo de 1999; documento WO99/33980 publicado el  
 8 de julio de 1999; Moore *et al.*, Science, 285: 260-263 (1999); Schneider *et al.*, J. Exp. Med., 189: 1747-1756  
 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, J. Biol. Chem., 274: 15978-15981 (1999).

La expresión "antagonista de BLYS" como se usa en el presente documento se usa en su sentido más amplio, e  
 25 incluye cualquier molécula que (1) se una con un polipéptido del BLYS de secuencia nativa o se una con un  
 polipéptido BR3 de secuencia nativa para bloquear parcial o completamente la interacción de BR3 con el polipéptido  
 BLYS, y (2) bloquee, inhiba o neutralice parcial o completamente la señalización de BLYS de secuencia nativa. La  
 señalización del polipéptido BLYS de secuencia nativa promueve, entre otras cosas, la supervivencia de células B y  
 maduración de células B. La inhibición, bloqueo o neutralización de la señalización de BLYS da como resultado,  
 30 entre otras cosas, una reducción del número de células B. Un antagonista de BLYS de acuerdo con la presente  
 invención bloqueará, inhibirá o neutralizará parcial o completamente una o más actividades biológicas de un  
 polipéptido BLYS, *in vitro* o *in vivo*. En una realización, un BLYS biológicamente activo potencia uno cualquiera o una  
 combinación de los siguientes acontecimientos *in vitro* o *in vivo*: una supervivencia aumentada de células B, un nivel  
 aumentado de IgG y/o IgM, un número aumentado de células plasmáticas y procesamiento de NF- $\kappa$ B2/100 a p52  
 35 NF- $\kappa$ B en células B plasmáticas (por ejemplo, Batten, M *et al.*, (2000) J. Exp. Med. 192:1453-1465; Moore, *et al.*,  
 (1999) Science 285: 260-263; Kayagaki, *et al.*, (2002) 10: 515-524). Se describen en el presente documento varios  
 ensayos útiles para ensayar antagonistas del BLYS.

Como se ha mencionado anteriormente, un antagonista de BLYS puede actuar de una manera directa o indirecta  
 40 para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o completamente la señalización de BLYS, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el  
 antagonista de BLYS puede unirse directamente con BLYS. Por ejemplo, se contemplan los anticuerpos anti-BLYS  
 que se unen dentro de una región de BLYS humano que comprende los restos de 162-275 y/o un resto adyacente de  
 un resto seleccionado del grupo que consiste en 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 y 265 de BLYS humano de modo  
 que el anticuerpo impida estéricamente la unión de BLYS con BR3. En otro ejemplo, un agente de unión directo es  
 45 un polipéptido que comprende el dominio extracelular de un receptor de BLYS tal como TACI, BR3 y BCMA. En otro  
 ejemplo, los antagonistas de BLYS incluyen los polipéptidos que tienen una secuencia de la de Fórmula I, Fórmula II,  
 Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6),  
 ECFDLLVRRWVPCMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC  
 ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32, como se describe en el presente documento. Como alternativa, el  
 50 antagonista de BLYS puede unirse con un dominio extracelular de un BR3 de secuencia nativa en su región de unión  
 a BLYS para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o completamente la unión de BLYS con BR3 *in vitro*, *in situ* o *in*  
*vivo*. Por ejemplo, dicho antagonista indirecto es un anticuerpo anti-BR3 que se une en una región de BR3 que  
 comprende los restos 23-38 de BR3 humano o una región adyacente de esos restos de modo que la unión de BR3  
 humano con BLYS esté impedida estéricamente.

55 En algunas realizaciones, un antagonista de BLYS incluye anticuerpos anti-BLYS, inmunoadhesinas y moléculas  
 pequeñas. En una realización adicional, la inmunoadhesiva comprende una región de unión a BLYS de un receptor  
 de BLYS (por ejemplo, un dominio extracelular de BR3, BCMA o TACI). En una realización adicional más, la

inmunoadhesina es BR3-Fc, o polipéptidos que tienen una secuencia de la de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRVWPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9) o secuencias enumeradas en la FIG. 32, opcionalmente, fusionadas o conjugadas con una parte Fc de una inmunoglobulina.

De acuerdo con una realización el antagonista de BLYS se une con un polipéptido BLYS o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 100 nM o menos. De acuerdo con otra realización, el antagonista de BLYS se une con un polipéptido BLYS o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 10 nM o menos. De acuerdo con otra realización más, el antagonista de BLYS se une con un polipéptido BLYS o un polipéptido BR3 con una afinidad de unión de 1 nM o menos.

Las expresiones "BR3", "polipéptido BR3" o "receptor BR3" cuando se usan en el presente documento abarcan "polipéptidos BR3 de secuencia nativa" y "variantes de BR3" (que se definen adicionalmente en el presente documento). "BR3" es una designación dada a los polipéptidos que comprenden una cualquiera de las secuencias polinucleotídicas y homólogos de las mismas:

(a) secuencia de BR3 humana (SEC ID N°:\_)

```

1 MRRGPRSLRG RDAPAPTPCV PAECFDLLVR HCVACGLLRT PRPKPAGASS PAPRTALQPQ
61 ESGVAGAGEA ALPLPGLLF APALLGLALV LALVLVGLVS WRRRQRRLRG ASSAEAPDGD
121 KDAPEPLDKV IILSPGISDA TAPAWPPPGE DPGTTPPGHS VVPATELGS TELVTTKTAG
181 PEQQ

```

(b) secuencia de BR3 humana alternativa (SEC ID N°:\_)

```

1 MRRGPRSLRG RDAPAPTPCV PAECFDLLVR HCVACGLLRT PRPKPAGAAS SPAPRTALQP
61 QESVAGAGEA AALPLPGLLF GAPALLGLAL VLALVLVGLV SWRRRQRRLR GASSAEAPDG
121 KDAPEPLDK VIILSPGISD ATAPAWPPPGE EDPGTTPPGH SVPVPATELG STELVTTKTA
181 GPEQQ

```

(c) secuencia de BR3 murina (SEC ID N°:\_)

```

1 MGARRLRVRS QRSRDSSVPT QCNQTECFDP LVRNCVSCSEL FHTPDTGHTS SLEPGTALQP
61 QEGSALRPDV ALLVGAPALL GLILALTLVG LVSLVSWRWR QQLRTASPDT SEGVOQESLE
121 NVFVPSSETP HASAPTWPPL KEDADSALPR HSPVPATEL GSTELVTTKT AGPEQ

```

(d) secuencia de BR3 de rata (SEC ID N°:\_)

```

1 MGVRRLRVRS RRSRDSPVST QCNQTECFDP LVRNCVSCSEL FYTPETRHAS SLEPGTALQP
61 QEGSGLRPDV ALLFGAPALL GLVLALTLVG LVSLVGWRWR QQRRTASLDT SEGVOQESLE
121 NVFVPPSETL HASAPNWPPF KEDADNILSC HSIPVPATEL GSTELVTTKT AGPEQ

```

y variantes o fragmentos de las mismas. Los polipéptidos BR3 pueden aislarse de diversas fuentes, tales como de tipos de tejido humanos o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes y/o sintéticos. El término BR3, incluye los polipéptidos BR3 descritos en los documentos WO 02/24909 y WO 03/14294.

Un polipéptido BR3 de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido BR3 correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos BR3 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "polipéptido BR3 de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas, solubles o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. Los polipéptidos BR3 de la invención incluyen el polipéptido BR3 que comprende o consiste en la secuencia contigua de los restos de aminoácidos 1 a 184 de un BR3 humano.

Un "dominio extracelular" o "ECD" de BR3 se refiere a una forma del polipéptido BR3 que está esencialmente sin los dominios transmembrana y citoplasmático. Las formas ECD de BR3 incluyen las que comprenden uno cualquiera de los aminoácidos 1 a 77, 2 a 62, 2-71, 1-61 y 2-63 de BR3.

Mini-BR3 es una región central de 26 restos del dominio de unión a BLYS de BR3: TPCVPAECFD LLVRHCVACG LLRTPR (SEC ID:\_.)

"Variante de BR3" significa un polipéptido BR3 que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un BR3 de longitud completa o ECD de BR3 de

secuencia nativa y se une con un polipéptido BLYS de secuencia nativa. Opcionalmente, la variante de BR3 incluye un único dominio rico en cisteína. Dichos polipéptidos variantes de BR3 incluyen, por ejemplo, polipéptidos BR3 en los que se añaden, o suprimen, uno o más restos de aminoácidos, en el extremo N y/o C terminal, así como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. También se contemplan fragmentos de ECD de BR3 que se unen con un polipéptido BLYS de secuencia nativa. Habitualmente, un polipéptido variante de BR3 tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y aún más preferentemente al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido BR3 humano o un fragmento específico del mismo. Los polipéptidos variantes de BR3 no abarcan la secuencia de polipéptido BR3 nativa. Habitualmente, los polipéptidos variantes de BR3 son al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, frecuentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

Las expresiones "TAC1" o "polipéptido TAC1" o "receptor TAC1" cuando se usan en el presente documento abarcan "polipéptidos TAC1 de secuencia nativa" y "variantes de TAC1" (que se definen adicionalmente en el presente documento). "TAC1" es una designación dada a los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de las Figuras 1A-1B, aminoácidos 1-246 de la Figura 5B y las secuencias de aminoácidos de la Figura 8, polipéptidos que están codificados por moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia polinucleotídica mostrada en las Figuras 1A-1B y 5A y homólogos, variantes y fragmentos de las mismas, moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia mostrada en las Figuras 1A-1B y 5A y variantes de las mismas así como fragmentos de los anteriores. Los polipéptidos TAC1 de la invención pueden aislarse de diversas fuentes, tales como de tipos tisulares humanos o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes y/o sintéticos.

Un polipéptido TAC1 de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido TAC1 correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos TAC1 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "polipéptido TAC1 de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas, solubles o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. Los polipéptidos TAC1 incluyen pero sin limitación los polipéptidos descritos en von Bulow *et al.*, mencionado anteriormente y documento WO98/39361 publicado el 11 de septiembre de 1998, la variante de corte y empalme (denominada "hTAC1(265)" anteriormente y mostrada en la Figura 8, comprendiendo el polipéptido TAC1 la secuencia contigua de los restos de aminoácidos 1-293 de la Figura 8).

Un "dominio extracelular" o "ECD" de TAC1 se refiere a una forma del polipéptido TAC1 que está esencialmente sin los dominios transmembrana y citoplasmático. Las formas ECD del TAC1 incluyen las descritas en von Bulow *et al.*, mencionado anteriormente, documentos WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979, WO 01/81417, restos de aminoácidos 1-166 de la Figura 1, restos de aminoácidos 1-165 de la Figura 1, restos de aminoácidos 1-154 de la Figura 1, restos de aminoácidos 1-114 de la Figura 1, restos de aminoácidos 1-119 de la Figura 5B, restos de aminoácidos 1-120 de la Figura 5B, y restos de aminoácidos 1-126 de la Figura 5B.

La "variante TACI" significa un polipéptido TACI que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un TACI de longitud completa o ECD de TACI de secuencia nativa y se une con un polipéptido BlyS de secuencia nativa. Dichos polipéptidos variantes de TACI incluyen, por ejemplo, polipéptidos TACI en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden, o suprimen, en el extremo N y/o C terminal, así como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. También se contemplan fragmentos del ECD de TACI que se unen con un polipéptido BlyS de secuencia nativa. Habitualmente, un polipéptido variante de TACI tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y aún más preferentemente al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido TACI codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en la Figura 1A o un fragmento específico de la misma. Los polipéptidos variantes de TACI no abarcan la secuencia del polipéptido TACI nativa. Habitualmente, los polipéptidos variantes de TACI son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, frecuentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

Las expresiones "BCMA" o "polipéptido BCMA" o "receptor BCMA" cuando se usan en el presente documento abarcan "polipéptidos BCMA de secuencia nativa" y "variantes de BCMA" (que se definen adicionalmente en el presente documento). "BCMA" es una designación dada a los polipéptidos que están codificados por las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias polinucleotídicas mostradas en la Figura 2 y variantes de las mismas, moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia mostrada en la Figura 2 y variantes de las mismas así como fragmentos de lo anterior. Los polipéptidos BCMA de la invención pueden aislarse de diversas fuentes, tales como de tipos tisulares humanos o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes y/o sintéticos.

Un polipéptido BCMA de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido BCMA correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos BCMA de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "polipéptido BCMA de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. Los polipéptidos BCMA de la invención incluyen los polipéptidos descritos en Laabi *et al.*, EMBO J., 11: 3897-3904 (1992); Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22: 1147-1154 (1994); Gras *et al.*, Int. Immunology, 7: 1093-1106 (1995); Madry *et al.*, Int. Immunology, 10: 1693-1702 (1998); y el polipéptido BCMA que comprende la secuencia contigua de los restos de aminoácidos 1-184 de la Fig. 2 (SEC ID N°: 4).

Un "dominio extracelular" o "ECD" de BCMA se refiere a una forma del polipéptido BCMA que está esencialmente sin los dominios transmembrana y citoplasmático. Las formas ECD de TACI incluyen las descritas en Laabi *et al.*, EMBO J., 11: 3897-3904 (1992); Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22: 1147-1154 (1994); Gras *et al.*, Int. Immunology, 7: 1093-1106 (1995); Madry *et al.*, Int. Immunology, 10: 1693-1702 (1998), restos de aminoácidos 4-55 de la Figura 2, restos de aminoácidos 1-48 de la Figura 2, restos de aminoácidos 8-41 de la Figura 2, restos de aminoácidos 4-51 de la Figura 2 o restos de aminoácidos 21-53 de la Figura 2.

“Variante BCMA” significa un polipéptido BCMA que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un BCMA o ECD de BCMA de secuencia nativa y se une con un polipéptido BlyS de secuencia nativa. Dichos polipéptidos variantes de BCMA incluyen, por ejemplo, polipéptidos BCMA en los que se añaden, o suprimen, uno o más restos de aminoácidos, en el extremo N y/o C terminal, así como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. También se contemplan fragmentos del ECD de BCMA que se unen con un polipéptido BlyS de secuencia nativa. Habitualmente, un polipéptido variante de BCMA tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos más preferentemente al menos aproximadamente 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y aún más preferentemente al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido BCMA codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en la Figura 2 o un fragmento específico de la misma. Los polipéptidos variantes BCMA no abarcan la secuencia del polipéptido BCMA nativa. Habitualmente, los polipéptidos variantes de BCMA son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, frecuentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más frecuentemente de al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

BAFF se expresa en bazo, ganglios linfáticos, PBL, monocitos, macrófagos, DC, células T, K562, HL-60 y G361. APRIL se expresa débilmente en bazo, páncreas, colon. APRIL se expresa en PBL y diversos tejidos y líneas celulares tumorales. BCMA se expresa en bazo, ganglios linfáticos, timo, PBL, hígado, glándulas adrenales y células B. TACI se expresa en bazo, timo, PBL, intestino delgado, células B y células T activadas. BAFF-R se expresa en bazo, ganglios linfáticos, timo, PBL, células B. BAFF-R se expresa en niveles bajos en células T en reposo (Mackay y Browning, julio de 2002, Nature Reviews, Immunology, 2: 465-475).

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Se entiende que la expresión sustitución de aminoácidos “conservativa” como se usa dentro de la presente invención se refiere a sustituciones de aminoácidos que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Los cambios de aminoácidos conservativos dan como resultados cambios silenciosos en la secuencia de aminoácidos del péptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de una polaridad similar actúan como equivalentes funcionales y dan como resultado una alteración silenciosa dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las sustituciones dentro un grupo pueden considerarse conservativas con respecto a la estructura y función. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que el papel de un resto particular se determina por su contexto dentro de la estructura tridimensional de la molécula en la que aparece. Por ejemplo, pueden aparecer restos Cys en forma oxidada (disulfuro), que es menos polar que la forma reducida (tiol). La parte alifática larga de la cadena lateral Arg puede constituir una característica crítica de su papel funcional o estructural, y esta puede conservarse mejor por sustitución de un resto no polar, mejor que otro básico. Además, se reconocerá que las cadenas laterales que contienen grupos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) pueden participar en interacciones iónico-aromático o “cati6n-pi”. En esos casos, la sustitución de una de estas cadenas laterales con un miembro del grupo 60 ácido o polar sin carga puede ser conservativa con respecto a su estructura y función. Los restos tales como Pro, Gly y Cys (forma disulfuro) pueden tener efectos directos en la conformación de cadena principal, y con frecuencia pueden no sustituirse sin distorsiones estructurales.

El “porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos (%)” con respecto a las secuencias polipeptídicas de ligando o receptor identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en dicha secuencia de ligando o receptor identificada en el presente documento, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, sin embargo, se obtienen valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos como se describe posteriormente usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la tabla posterior. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla posterior se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la tabla posterior. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se exponen por el programa ALIGN-2 y no varían.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones en una proteína que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina “mutagénesis de exploración de alanina” como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con una diana de unión. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario determinar la naturaleza de la mutación en sí misma. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de exploración de alanina o aleatoria en el cod6n o región diana y las variantes expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

La expresión “ángulo dihédrico” se refiere a la rotación en torno a un enlace. Véase, por ejemplo, Creighton, T.E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2 ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York, NY.

El término “fi” es un ángulo dihédrico que indica una rotación en torno al enlace N-C $\alpha$  de un aminoácido. Véase, por ejemplo Creighton, T.E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2 ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York, NY.

Los giros beta de tipo I se describen en Hutchinson, E. G. y Thornton, J. M. (1994) A revised set of potentials for beta turn formation in proteins. Protein Science 3, 2207-2216.

Una “proteína de fusión” y un “polipéptido de fusión” se refiere a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalentemente entre sí, en el que cada una de las dos partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad puede ser también una propiedad química o física sencilla, tal como unión con una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden unirse directamente por un único enlace peptídico o a través de un enlazador peptídico

que contiene uno o más restos de aminoácidos. En general, las dos partes y el enlazador estarán en fase de lectura entre sí.

Un “conjugado” se refiere a cualquier molécula híbrida, incluyendo proteínas de fusión y así como moléculas que contienen tanto partes de aminoácidos o proteínas como partes no proteicas. Los conjugados pueden sintetizarse por diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, síntesis de fase sólida, síntesis de fase en solución, técnicas sintéticas de química orgánica o una combinación de esas técnicas. La elección de síntesis dependerá de la molécula particular para generar. Por ejemplo, una molécula híbrida de naturaleza no completamente “proteica” puede sintetizarse por una combinación de técnicas recombinantes y técnicas de fase en solución.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Por ejemplo, son inmunoadhesinas útiles de acuerdo con la presente invención polipéptidos que comprenden las partes de unión a BlyS de un receptor de BlyS sin las secuencias transmembrana o citoplasmática del receptor de BlyS. En una realización, el dominio extracelular de BR3, TACI o BCMA se fusiona con un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina. Por ejemplo, una inmunoadhesina BR3-Fc de ratón e inmunoadhesina BR3-Fc humana pueden representarse por las fórmulas:

mBR3-Fc (SEC ID N°: 1):

**MSALLLALVGA AVASTGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTPDTGHTS  
SLEPGTALQPQEGQVTGDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDIS  
KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL  
PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDF  
FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHH  
TEKLSLHSPGK**

hBR3-hIgG1 Fc (SEC ID N°: 2)

**MSALLLALVGA AVASTRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASS  
PAPRTALQPQESQVTDKAAHYTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTEVTCVVVAVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofólico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuoona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamine; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuoona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina;

arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes de intercalación, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa CD20, bien *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan PSCA en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también se extienden hasta detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en células.

El término “mamífero” se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero en el presente documento es un ser humano.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco antagonista eficaz para “aliviar” o “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de “tratado” posterior. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

Los anticuerpos anti-CD20 de la invención pueden producirse por transfección transitoria o estable de células hospedadoras eucariotas tales como células CHO.

“Vehículos” como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>™</sup>, polietilenglicol (PEG) y

PLURONICS™.

### 1. Antagonistas de BLYS polipeptídicos

- 5 Los polipéptidos útiles como antagonistas de BLYS incluyen, por ejemplo, el polipéptido denominado TALL-1 12-3 como SEC ID N°: 123 en el documento WO 02/092620, la secuencia de aminoácidos proporcionada aquí:

MLPGCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLPGCKWDLLIKQWVCDPLGGGG  
 GVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPVTCWWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
 HNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N° 10)

- 10 Este polipéptido se une con BLYS e inhibe la unión de BR3 con BLYS.  
 En algunas realizaciones, los péptidos de 17 unidades son solubles (preferentemente no unidos a membrana) y pueden usarse como secuencias centrales o combinarse o conjugarse de otro modo con diversas estructuras como se describe posteriormente. Algunos aminoácidos en el polipéptido de 17 unidades se seleccionaron aleatoriamente y se exploraron con respecto a sustituciones conservativas y no conservativas. Como se entiende por un experto habitual en la materia y se describe en el presente documento, pueden conseguirse adiciones y sustituciones de manera limitada sin alterar la unión de BLYS del péptido de 17 unidades resultante y construcciones que incluyen el péptido de 17 unidades resultante. Se proporciona a continuación y en los ejemplos orientación con respecto a sustituciones permitidas que producen función de unión a BLYS. En algunas realizaciones, los restos implicados en relaciones de afinidad de unión o estructural están conservados, lo que significa que la identidad de aminoácido se conserva o se realiza una sustitución conservativa como se describe en las fórmulas y descripción posteriores.

- 25 Un antagonista del polipéptido de BLYS puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, una secuencia enumerada en la FIG.32, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHEMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), y mezclas de los mismos.

En un aspecto de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

- 30  $X_1-C_N-X_3-D-X_5-L-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-C_T-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$  (Fórmula I)

- en la que  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_5$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$ ,  $X_{11}$ ,  $X_{12}$ ,  $X_{14}$ ,  $X_{15}$  y  $X_{17}$  son cualquier aminoácido excepto cisteína; y en la que  $X_{16}$  es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, F, I y V; y en la que el polipéptido no comprende una cisteína a una distancia de siete restos de aminoácidos en dirección N terminal de  $C_N$  (cisteína N terminal) y C terminal de  $C_T$  (cisteína C terminal) de Fórmula I.

- En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende la secuencia de Fórmula I tiene  $C_N$  y  $C_T$  unidas por enlaces disulfuro;  $X_5LX_7X_8$  que forma la conformación de una estructura de giro beta de tipo I con el centro del giro entre L y  $X_7$ ; y tiene un valor positivo para el ángulo dihédrico  $\phi$  de  $X_8$ .

- 40 En algunas realizaciones,  $X_{10}$  se selecciona del grupo que consiste en W, F, V, L, I, Y, M y un aminoácido no polar. En algunas realizaciones  $X_{10}$  es W. En algunas realizaciones,  $X_3$  es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, V, L, I, Y, F, W y un aminoácido no polar. En algunas realizaciones,  $X_5$  se selecciona del grupo que consiste en V, L, P, S, I, A y R. En algunas realizaciones,  $X_7$  se selecciona del grupo que consiste en V, T, I y L. En algunas realizaciones,  $X_8$  no es T o I. En algunas realizaciones,  $X_8$  se selecciona del grupo que consiste en cualquiera de R, K, G, N, H y un aminoácido D. En algunas realizaciones,  $X_9$  se selecciona del grupo que consiste en H, K, A, R y Q. En algunas realizaciones,  $X_{11}$  es I o V. En algunas realizaciones,  $X_{12}$  se selecciona del grupo que consiste en P, A, D, E y S. En algunas realizaciones,  $X_{16}$  es L.

- 50 En realizaciones específicas, la secuencia de Fórmula I es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHEMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9).

En otro aspecto de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula II:

- 55  $X_1-C_N-X_3-D-X_5-L-V-X_8-X_9-W-X_{11}-X_{12}-C_T-X_{14}-X_{15}-L-X_{17}$  (Fórmula II)

- en la que  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_5$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{11}$ ,  $X_{12}$ ,  $X_{14}$ ,  $X_{15}$  y  $X_{17}$  son cualquier aminoácido excepto cisteína; y en la que el polipéptido no comprende una cisteína a una distancia de siete restos de aminoácidos en dirección N terminal de  $C_N$  (cisteína N terminal) y en dirección C terminal de  $C_T$  (cisteína C terminal) de Fórmula II.

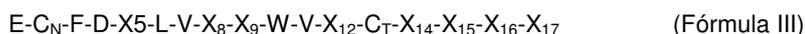
En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende la secuencia de Fórmula I tiene  $C_N$  y  $C_T$  unidas por enlaces

disulfuro;  $X_5LVX_8$  que forma la conformación de una estructura de giro beta de tipo I con el centro del giro entre L y  $X_7$ ; y tiene un valor positivo para el ángulo dihédrico  $\phi$  de  $X_8$ .

En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_3$  es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, A, V, L, I, Y, F, W y un aminoácido no polar. En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_5$  se selecciona del grupo que consiste en V, L, P, S, I, A y R. En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_8$  se selecciona del grupo que consiste en R, K, G, N, H y un aminoácido D. En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_9$  se selecciona del grupo que consiste en H, K, A, R y Q. En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_{11}$  se selecciona del grupo que consiste en I y V. En algunas realizaciones de Fórmula II,  $X_{12}$  se selecciona del grupo que consiste en P, A, D, E y S.

En otros aspectos, el polipéptido comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 32.

Otro aspecto de la invención incluye un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula III:



en la que  $X_5$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{12}$ ,  $X_{14}$ ,  $X_{15}$  y  $X_{17}$  son cualquier aminoácido excepto cisteína;

en la que  $X_{16}$  es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, F, I y V;

en la que el polipéptido no comprende una cisteína a una distancia de siete restos de aminoácidos en dirección N terminal de  $C_N$  (cisteína N terminal) y C terminal de  $C_T$  (cisteína C terminal) de Fórmula III; y en la que  $C_N$  y  $C_T$  están unidas por enlaces disulfuro.

En algunas realizaciones de Fórmula III, el polipéptido que comprende la secuencia contigua de Fórmula III tiene un enlace disulfuro entre  $C_N$  y  $C_T$  y forma una estructura de giro beta de tipo I con el centro del giro entre L y V en  $X_5LVX_8$ ; y tiene un valor positivo para el ángulo dihédrico  $\phi$  de  $X_8$ .

En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_5$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{12}$ ,  $X_{14}$ ,  $X_{15}$  y  $X_{17}$  se seleccionan del grupo que consisten en L, P, H, R, I, T, N, S, V, A, D y G. En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_5$  es L y  $X_8$  es R. En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_9$  se selecciona del grupo que consiste en H, K, A, S, R y Q. En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_{12}$  se selecciona del grupo que consiste en P, A, D, E y S. En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_{12}$  es P. En algunas realizaciones de Fórmula III,  $X_{16}$  es L.

En realizaciones específicas, la secuencia de Fórmula III se selecciona del grupo que consiste en ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8) y ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9).

También se incluye un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica contigua seleccionada del grupo que consiste en ECFDLLVRAWVPCSVLK, ECFDLLVRHWVPCGLLR, ECFDLLVRRWVPCEMLG, ECFDLLVRSWVPCHMLR, y ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 5 a 9). La presente invención también se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 32. Los polipéptidos que comprenden una cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 32 preferentemente unen la cisteína de la secuencia por enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, la secuencia entre el quinto y octavo restos de la secuencia forma una conformación de una estructura de giro beta de tipo I con el centro de giro entre L y  $X_7$  y el octavo resto tiene un valor positivo para el ángulo dihédrico  $\phi$ .

En algunas realizaciones, los polipéptidos BlyS de la presente invención son secuencias contiguas. La presente invención también se refiere a un polipéptido que comprende al menos 88 % de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica de 17 unidades contigua seleccionada del grupo que consiste en: ECFDLLVRAWVPCSVLK, ECFDLLVRHWVPCGLLR, ECFDLLVRRWVPCEMLG, ECFDLLVRSWVPCHMLR y ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 5-9). En otras realizaciones la identidad de secuencia es de al menos el 64 %, y cada número entero sucesivo hasta el 100 % después de alinear para proporciona la homología máxima. La homología se reduce para huecos de secuencia y secuencias más cortas que las 17 unidades de la presente invención después de alinear para proporcionar máxima homología. Ni las extensiones ni las inserciones ni N ni C terminales deberían interpretarse como reductoras de la homología.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el polipéptido es de menos de 50 aminoácidos de longitud, menos de 25 aminoácidos de longitud, o es de 17 unidades.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención comprenden secuencias polipeptídicas adicionales N terminales, C terminales o tanto N terminales como C terminales de la secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32. Las secuencias polipeptídicas adicionales son heterólogas de un polipéptido BR3 de secuencia nativa, e incluyen, por ejemplo, la parte Fc de inmunoglobulinas.

En otro aspecto de la invención, los polipéptidos antagonistas de BlyS comprenden al menos uno y más

preferentemente, más de uno de un polipéptido que comprende una secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32. Los polipéptidos que se unen entre sí pueden tener la misma secuencia o tienen secuencias diferentes. En algunas realizaciones, estos polipéptidos pueden unirse entre sí, opcionalmente, mediante el uso de un enlazador. El enlazador actúa como un espaciador y puede realizarse de diversos compuestos químicos. En algunas realizaciones, el enlazador es un polipéptido que tiene de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos. Los expertos en la materia conocen las secuencias enlazadoras. Por ejemplo, las secuencias enlazadoras incluyen GGGKGGGG y GGGNSSGG y similares. En realizaciones específicas, los polipéptidos unidos entre sí tienen la misma secuencia y comprenden una fórmula: PP1-L1-PP1-L2-PP1, en la que PP1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), y secuencias enumeradas en la FIG. 32, y L1 y L2 son secuencias enlazadoras que son de secuencia diferente.

Los antagonistas para la unión de BLyS con BR3, tales como los polipéptidos descritos en el presente documento, preferentemente se une con BLyS con una afinidad igual o mayor que una secuencia de BR3 nativa, tal como ECD de BR3 de SEC ID N°: \_ o mini-BR3 de SEC ID N°: . En algunas realizaciones, los polipéptidos que tienen una secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 tienen una afinidad de unión por BLyS de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente 10 nM o menos, o 1 nM o menos. Se proporciona en los Ejemplos un método para medir la afinidad de unión.

Un método usado en la presente invención para encontrar antagonistas de BLyS implica identificar, modificar y seleccionar aleatoriamente de forma selectiva una secuencia central de 17 restos de BR3. Se describen adicionalmente posteriormente y en los ejemplos técnicas específicas usadas. En algunas realizaciones, el resto de cisteína N terminal ( $C_N$ ) en la posición  $X_2$  y cisteína C terminal ( $C_T$ ) en la posición  $X_{13}$  están conservados y preferentemente forman un enlace disulfuro. En algunas realizaciones,  $C_N$  y  $C_T$  están separadas por 10 aminoácidos contiguos. Preferentemente, la secuencia de 17 unidades no contiene ningún resto de cisteína distinto de las posiciones  $X_2$  y  $X_{13}$ . Adicionalmente, si la secuencia de 17 unidades se incluye en una estructura mayor, las secuencias que flanquean la secuencia de 17 unidades preferentemente no incluirán ningún resto de cisteína a una distancia de 7 aminoácidos de  $C_N$  o  $C_T$ .  $X_{10}$  se sustituye con cualquier aminoácido no polar excepto cisteína; por ejemplo: W, F, V, L, I, Y o M. En algunas realizaciones,  $X_{10}$  es W.

En algunas realizaciones, el motivo D- $X_5$ -L- $X_7$  está conservado debido a su contribución demostrada a la unión de BLyS. En algunas realizaciones, se forma un giro beta localizado entre  $C_N$  y  $C_T$  entre  $X_4$  y  $X_7$ . En algunas realizaciones, el centro del giro beta se sitúa entre L- $X_7$ . En algunas realizaciones, la estructura de los péptidos de 17 unidades de la presente invención es generalmente de dos cadenas beta unidas por un giro beta de tipo I, que forma una horquilla beta conectada por un enlace disulfuro entre  $C_N$  y  $C_T$ . Adicionalmente, en algunas realizaciones, el resto  $X_8$  adopta un valor positivo para el ángulo dihédrico  $\phi$  de  $X_8$  para acomodar el giro beta de tipo I en la estructura en horquilla beta.

La información estructural adicional indica que D en  $X_4$  y L en  $X_6$  están internados en la interfaz de BLyS-BR3 del complejo BLyS-BR3. En algunas realizaciones, estos restos están conservados. El resto en  $X_7$  también está internado en la interfaz BLyS-BR3. En algunas realizaciones,  $X_7$  puede seleccionarse del grupo que consiste en V, T, I y L. En algunas realizaciones,  $X_7$  es preferentemente V. En algunas realizaciones, el motivo de  $X_4$  a  $X_7$  es DLLV.

En algunas realizaciones, la longitud de la región de unión del antagonista de BLyS es de 17 aminoácidos. En algunas realizaciones, el antagonista de BLyS polipeptídico es de 17 aminoácidos. En algunas realizaciones, hay cuatro aminoácidos,  $X_{14}$ - $X_{17}$ , después de  $C_T$  en el extremo C terminal. En algunas realizaciones,  $X_{16}$  forma un contacto hidrófobo con BLyS cuando la secuencia de 17 unidades está unida y conservada. En algunas realizaciones  $X_{16}$  es L.

## 2. Polinucleótidos, vectores, células hospedadoras

De acuerdo con algunas realizaciones, los polipéptidos antagonistas de BLyS se seleccionan del grupo que consiste en: péptidos de 17 unidades descritos en el presente documento, polipéptidos que incorporan uno o más péptidos de 17 unidades como regiones centrales, y formas modificadas covalentemente de los péptidos y polipéptidos de 17 unidades (por ejemplo, inmunoadhesinas, polipéptidos marcados, polipéptidos protegidos, polipéptidos conjugados, proteínas de fusión, etc.). Se describen en el presente documento diversas técnicas que se emplean para realizar estas formas de polipéptidos. Se conocen en la técnica métodos para marcar polipéptidos y conjugar moléculas con polipéptidos.

Pueden prepararse composiciones de la invención usando técnicas recombinantes conocidas en este campo. La

descripción posterior se refiere a métodos para producir dichos polipéptidos cultivando células hospedadoras transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico codificante y recuperando el polipéptido del cultivo celular. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el polipéptido deseado puede insertarse en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. Están disponibles públicamente diversos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales se describe posteriormente. Se conocen en la técnica secuencias de señal opcionales, originales de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción que pueden emplearse y se describen en más detalle en el documento WO97/25428.

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente con la secuencia de ácido nucleico codificante. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas cadena arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente a una distancia de 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, con la que están unidos operativamente. Dichos promotores normalmente quedan en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician los niveles aumentados de transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. En este momento se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. Estos promotores se unen operativamente con el ADN codificante retirando el promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotor aislada en el vector.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente enumerados emplea técnicas de ligamiento convencionales. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, adaptan y vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Para análisis para confirmar secuencias correctas en plásmidos construidos, las mezclas de ligamiento pueden usarse para transformar *E. coli* K12 cepa 294 (ATCC 31.446) y los transformantes exitosos se seleccionan por resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan por digestión con endonucleasas de restricción y/o se secuencian usando técnicas convencionales conocidas en este campo. [Véase, por ejemplo, Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981); Maxam *et al.*, Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)].

Pueden emplearse vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero del ADN codificante. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficazmente en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora acumule muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice altos niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión [Sambrook *et al.* mencionado anteriormente]. Los sistemas de expresión transitorios, que comprenden un vector de expresión y una célula hospedadora adecuados, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADN clonados, así como para la rápida exploración de dichos polipéptidos con respecto a propiedades biológicas o fisiológicas deseadas.

Se describen otros métodos, vectores y células hospedadoras adecuados para adaptación a la síntesis del polipéptido deseado en cultivos de células de vertebrados recombinantes en Gething *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este fin incluyen pero sin limitación eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferentemente, la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores. Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptido glucosilado derivan de organismos multicelulares. Se describen adicionalmente ejemplos de todas estas células hospedadoras en el documento WO97/25428.

Las células hospedadoras se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

- 5 La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si de hecho se expresa alguna secuencia codificante como si no. Se conocen numerosos métodos de transfección por los expertos habituales en la materia, por ejemplo, CaPO<sub>4</sub> y electroporación. La transfección exitosa generalmente se reconoce cuando aparece cualquier indicación de la operación de este vector dentro de la célula hospedadora.
- 10 La transformación significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, o electroporación se usan generalmente para procariontas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciosas.
- 15 La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para transformación de ciertas células vegetales, como se describe en Shaw *et al.*, Gene, 23: 315 (1983) y documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Además, pueden transfectarse plantas usando tratamiento con ultrasonidos como se describe en el documento WO 91/00358 publicado el 10 de enero de 1991.
- 20 Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transformaciones de sistemas hospedadores de células de mamífero en la Patente de Estados Unidos N° 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336: 348-352 (1988).
- 25
- 30 Las células procariontas pueden cultivarse en medios de cultivo adecuados como se describe en general en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Los ejemplos de medios de cultivo disponibles en el mercado incluyen F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultará evidente para los expertos habituales en la materia.
- 35
- 40

45 En general, pueden encontrarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células de mamífero en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Los polipéptidos expresados pueden recuperarse del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también pueden recuperarse de lisados de células hospedadoras cuando se produzcan directamente sin una señal secretora. Si el polipéptido está unido a membrana, puede liberarse de la membrana usando una solución de detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X 100) o su región extracelular puede liberarse por escisión enzimática.

50

Cuando se produce el polipéptido en una célula recombinante distinta de una de origen humano, esta está libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es habitualmente necesario recuperar o purificar el polipéptido de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas. Como una primera etapa, el medio de cultivo o lisado puede centrifugarse para retirar los residuos celulares en partículas. Los siguientes son procedimientos ejemplares para procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofluore; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de proteína A Sepharose para retirar contaminantes tales como IgG.

55

60

### Presentación de fagos

65 Pueden utilizarse en la presentación de fagos polipéptidos de la presente invención seleccionados del grupo que consiste en: Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCMLR (SEC ID N° 8),

ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), y secuencias enumeradas en la FIG. 32.

Usar las técnicas de presentación de fagos permite la generación de grandes bibliotecas de variantes proteicas que pueden clasificarse rápidamente con respecto a las secuencias que se unen con una molécula diana con alta afinidad. Se fusionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de recubrimiento viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de presentación de fagos monovalentes en los que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III (Bass, S., *Proteins*, 8: 309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3: 205 (1991)). En un sistema de presentación de fagos monovalente, la fusión génica se expresa a niveles bajos y también se expresan proteínas del gen III de tipo silvestre de modo que se conserva la infecciosidad de las partículas. Se han desvelado métodos para generar bibliotecas de péptidos y explorar esas bibliotecas en muchos patentes (por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 5.723.286, Patente de Estados Unidos N° 5.432.018, Patente de Estados Unidos N° 5.580.317, Patente de Estados Unidos N° 5.427.908 y Patente de Estados Unidos N° 5.498.530).

En algunas realizaciones, la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se expresan como bibliotecas de péptidos en fagos. Los fagos que expresan la biblioteca de polipéptidos de Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se someten después a selección basándose en la unión con BLYS. En algunas realizaciones, el proceso de selección implica permitir que algunos fagos se unan con BLYS biotinilado que se une posteriormente con una placa de neutravidina. Se recuperan y propagan fagos unidos a las placas a través de la unión con BLYS-biotina-neutravidina. En algunas realizaciones, los fagos se someten a varios ciclos de selección. En algunas realizaciones, los fagos se incuban con BLYS-biotina, seguido de la adición del BLYS no biotinilado como un agente de unión competitivo. Se proporciona orientación adicional del uso de presentación de fagos en el contexto de la presente invención en los ejemplos.

### **Polipéptidos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos**

Se contemplan además para su uso en los métodos del presente documento moléculas de inmunoadhesina que comprenden los polipéptidos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula comprende una fusión de un polipéptido de la presente invención con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la inmunoadhesina, dicha fusión comprende de forma útil la región Fc de una molécula IgG. En una realización adicional, la región Fc es de una molécula IgG1 humana. En algunas realizaciones, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995 y Chamow *et al.*, TIBTECH, 14: 52-60 (1996).

El diseño de inmunoadhesina más simple y más sencillo combina con frecuencia el dominio o los dominios de unión de la adhesina (por ejemplo, polipéptido antagonista de la presente invención) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 puede unirse covalentemente con una parte de Fc de una inmunoglobulina. Además, uno o más de estos polipéptidos pueden unirse con otro y unirse con una parte Fc de una inmunoglobulina.

Habitualmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará en el extremo C terminal con el ácido nucleico que codifica el extremo N terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo también son posibles fusiones N terminales.

Normalmente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado conservará al menos los dominios bisagra, CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones con el extremo C terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N terminal del CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien y pueden seleccionarse sitios particulares para optimizar la actividad biológica, secreción o características de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona con el extremo N terminal de la región Fc de inmunoglobulina G1 (IgG1). Es posible fusionar la región constante de cadena pesada completa con la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferentemente, se usa en la fusión una secuencia que comienza en la región bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión de papaína que define IgG Fc químicamente (es decir el resto 216, considerando que el primer resto de la región constante de cadena pesada es 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de adhesina se fusiona con (a) la región bisagra y CH2 y CH3 o (b) los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro. También pueden existir globulina IgA, y ocasionalmente globulina IgG en forma multimérica en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades pueden ser iguales o diferentes.

Se presentan en un diagrama esquemático a continuación diversas inmunoadhesinas ensambladas ejemplares dentro del alcance del presente documento:

- (a) ACL-ACL;
- (b) ACH-(ACH, ACL-ACH, ACL-VHCH, o VLCL-ACH);
- (c) ACL-ACH-(ACL-ACH, ACL-VHCH, VLCL-ACH, o VLCL-VHCH)
- (d) ACL-VHCH-(ACH, or ACL-VHCH, o VLCL-ACH);
- (e) VLCL-ACH-(ACL-VHCH, o VLCL-ACH); y
- (f) (A-Y)<sub>n</sub>-(VLCL-VHCH)<sub>2</sub>,

en las que cada A representa polipéptidos idénticos o diferentes que comprenden una secuencia de aminoácidos de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 o combinaciones de las mismas;

VL es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VH es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero mayor de 1;

Y designa el resto de un agente de reticulación covalente.

Para mayor brevedad, las estructuras anteriores solamente muestran características clave; no indican dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas, ni se muestran enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando se requieran dichos dominios para la actividad de unión, se construirán para que estén presentes en las localizaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Como alternativa, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de modo que se obtenga una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada rama de una inmunoglobulina, bien entre la bisagra y el dominio CH<sub>2</sub>, o bien entre los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Se han presentado construcciones similares en Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol., 28: 1027-1037 (1991).

Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no se requiere en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente bien asociada covalentemente con un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina, o fusionado directamente con la adhesina.

En el primer caso, normalmente se coexpresa ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina con el ADN que codifica la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina con enlaces disulfuro. Se desvelan métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567, expedido el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen más convenientemente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la parte de adhesina en fase con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede usarse fusión con fragmentos de inmunoglobulina genómicos (véase, por ejemplo, Aruffo *et al.*, Cell, 61: 1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.*, Cell, 66: 1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras Ig para su expresión. Pueden aislarse ADNc que codifican regiones constantes de cadena pesada de IgG basándose en secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos de bazo o sangre periférica, por hibridación o por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la expresión eficaz en las células hospedadoras elegidas.

También se contemplan por la invención formas de cremallera de leucina de estas moléculas. La "cremallera de leucina" es una expresión en la técnica usada para hacer referencia a una secuencia rica en leucina que potencia, promueve o conduce la dimerización o trimerización de su compañero de fusión (por ejemplo, la secuencia o molécula con la que se fusiona o se une la cremallera de leucina). Se han descrito en la técnica diversos polipéptidos de cremallera de leucina. Véase, por ejemplo, Landschulz *et al.*, Science, 240: 1759 (1988); Patente de

Estados Unidos 5.716.805; documento WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341: 24 (1989). Los expertos en la materia apreciarán que una secuencia de cremallera de leucina puede fusionarse en el extremo 5' o 3' del polipéptido de la presente invención.

5 Los polipéptidos desvelados en el presente documento también pueden modificarse de manera que forman moléculas quiméricas fusionando el polipéptido con otra secuencia de aminoácidos o polipeptídica heteróloga. De acuerdo con algunas realizaciones, dicha secuencia de aminoácidos o polipeptídica heteróloga es una que actúa para oligomerizar la molécula quimérica. En algunas realizaciones, dicha molécula quimérica comprende una fusión de polipéptido con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo con el que puede unirse selectivamente el anticuerpo anti-marcador. El epítipo marcador se coloca generalmente en el extremo carboxilo o amino terminal del polipéptido. La presencia de dichas formas marcadas con epítipo del polipéptido puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, la provisión del marcador epitópico permite al polipéptido purificarse fácilmente mediante purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se une con el marcador epitópico. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de marcador de HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de los mismos [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y el marcador de glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epitópico KT3 [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido epitópico de tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

## 25 **Construcción de conjugados de Péptido-Polímero**

En algunas realizaciones la estrategia para la conjugación de un polímero, (por ejemplo, PEGilación) de péptidos sintéticos consiste en combinar, mediante la formación de un enlace conjugado en solución, un péptido y un resto de PEG, que portan cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva para el otro. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis de fase sólida convencional. Los péptidos se "preactivan" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan completamente antes de reaccionar con el resto de PEG. El ligamiento del péptido con PEG habitualmente tiene lugar en fase acuosa y puede controlarse fácilmente por HPLC analítica de fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse fácilmente por HPLC preparatoria y caracterizarse por HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de desorción por láser.

### a. Sitios reactivos a péptidos.

En algunas realizaciones, un péptido se enlaza covalentemente mediante uno o más de los restos de aminoácidos del péptido con un grupo reactivo terminal en el polímero, dependiendo principalmente de las condiciones de reacción, el peso molecular del polímero, etc. El polímero con el grupo o los grupos reactivos se designa en el presente documento como polímero activado. El grupo reactivo reacciona selectivamente con grupos amino libres u otros grupos reactivos en el péptido. Los sitios reactivos potenciales incluyen: grupo amino N terminal, grupos amino épsilon en restos de lisina, así como otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo y otros hidrófilos. Se entenderá, sin embargo, que el tipo y cantidad del grupo reactivo elegido, así como el tipo de polímero empleado, para obtener resultados óptimos, dependerá del péptido particular empleado para evitar que el grupo reactivo reaccione con demasiados grupos particularmente activos en el péptido. En algunas realizaciones, un resto reactivo (por ejemplo, lisina (K), un aminoácido modificado, no natural u otra molécula pequeña) puede sustituirse en una posición adecuada para conjugación.

En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 tienen un grupo reactivo terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende al menos uno y más preferentemente, más de uno de un polipéptido que comprende una secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N° 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N° 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N° 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEC ID N° 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N° 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32. Los polipéptidos que se unen entre sí pueden tener la misma secuencia o tener diferentes secuencias y un grupo reactivo terminal. En algunas realizaciones, estos polipéptidos pueden unirse entre sí, opcionalmente, mediante el uso de un enlazador.

Aunque puede producirse conjugación en cualquier aminoácido reactivo en el polipéptido, en algunas realizaciones, el aminoácido reactivo es lisina, que se une con el grupo reactivo del polímero activado mediante su grupo amino épsilon libre, o ácido glutámico o aspártico, que se une con el polímero mediante un enlace amida. En algunas realizaciones, los aminoácidos reactivos del péptido no son restos de cisteína en las posiciones X<sub>2</sub> y X<sub>12</sub>.

El grado de conjugación de polímeros con cada péptido variará dependiendo del número de sitios reactivos en el péptido, el peso molecular, la hidrofilia y otras características del polímero, y los sitios de derivatización de péptidos particulares seleccionados. En algunas realizaciones, el conjugado tiene una relación molar final de 1 a 10 moléculas de polímero por cada molécula peptídica, pero también se contemplan números mayores de moléculas de polímeros unidas a los péptidos de la invención. En algunas realizaciones, cada conjugado contiene una molécula polimérica. La cantidad deseada de derivatización se consigue fácilmente usando una matriz experimental en la que el tiempo, la temperatura y otras condiciones de reacción se varían para cambiar el grado de sustitución, después de lo cual se determina el nivel de sustitución polimérica de los conjugados por cromatografía de exclusión por tamaño u otros medios conocidos en la técnica.

#### b. Polímeros activados

En algunas realizaciones, el polímero contiene solamente un único grupo que es reactivo. Esto ayuda a evitar la reticulación de moléculas proteicas. Sin embargo, está dentro del alcance del presente documento maximizar las condiciones de reacción para reducir la reticulación, o para purificar los productos de reacción mediante filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar derivados sustancialmente homogéneos. En otras realizaciones, el polímero contiene dos o más grupos reactivos para el fin de unir múltiples péptidos con la cadena principal polimérica. De nuevo, puede usarse filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar el derivado deseado en una forma sustancialmente homogénea. En algunas realizaciones, el polímero se enlaza covalentemente directamente con el péptido sin el uso de un agente de reticulación multifuncional (habitualmente bifuncional). En algunas realizaciones, hay una relación molar 1:1 de cadena de PEG y péptido.

La reacción de modificación covalente puede tener lugar por cualquier método apropiado usado en general para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, preferentemente a aproximadamente pH 5-9, más preferentemente 7-9 si los grupos reactivos en el péptido son grupos de lisina. Generalmente, el proceso implica preparar un polímero activado (el polímero que tiene normalmente al menos un grupo hidroxilo terminal para activar), preparar un sustrato activo a partir de este polímero, y hacer reaccionar a continuación el péptido con el sustrato activo para producir el péptido adecuado para formulación. La reacción de modificación anterior puede realizarse por varios métodos, que pueden implicar una o más etapas. Los ejemplos de agentes de modificación que pueden usarse para producir el polímero activado en una reacción de una etapa incluyen cloruro del ácido cianúrico (2,4,6-ticloro-*S*-triazina) y fluoruro de ácido cianúrico.

En algunas realizaciones, la reacción de modificación tiene lugar en dos etapas en la que el polímero se hace reaccionar en primer lugar con un anhídrido ácido tal como anhídrido succínico o glutárico para formar un ácido carboxílico, y el ácido carboxílico se hace reaccionar después con un compuesto capaz de reaccionar con el ácido carboxílico para formar un polímero activado con un grupo éster reactivo que es capaz de reaccionar con el péptido. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen *N*-hidroxisuccinimida, ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoesulfónico, y similares, y preferentemente se usa *N*-hidroxisuccinimida o ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoesulfónico. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar PEG monometil sustituido a temperaturas elevadas, preferentemente aproximadamente 100-110 °C durante cuatro horas, con anhídrido glutárico. El monometil PEG-ácido glutárico producido de este modo se hace reaccionar después con *N*-hidroxisuccinimida en presencia de un reactivo de carbodiimida tal como dicitclohexil o isopropil carbodiimida para producir el polímero activo, metoxipolietileno glicolil-*N*-succinimidil glutarato, que después puede hacerse reaccionar con el GH. Este método se describe en detalle en Abuchowski *et al.*, *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984). En otro ejemplo, el PEG monometil sustituido puede hacerse reaccionar con anhídrido glutárico seguido de reacción con ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoesulfónico (HNSA) en presencia de dicitclohexil carbodiimida para producir el polímero activado. HNSA se describe en Bhatnagar *et al.*, *Peptides: Synthesis-Structure-Function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium*, Rich *et al.* (eds.) (Pierce Chemical Co., Rockford Ill., 1981), p. 97-100, y en Nitecki *et al.*, *High-Technology Route to Virus Vaccines* (American Society for Microbiology: 1986) titulado "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Applications."

En algunas realizaciones, se consigue unión covalente con grupos amino por químicas conocidas basadas en el cloruro cianúrico, carbonilo diimidazol, grupos reactivos aldehído (PEG alcóxido más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, succinimidil ésteres activados, ditiocarbonato PEG activado, 2,4,5-triclorofenilcloroformato o PEG activado por *P*-nitrofenilcloroformato). Los grupos carboxilo se derivatizan acoplado PEG-amina usando carbodiimida. Los grupos sulfhidrido se derivatizan acoplado con PEG maleimido sustituido (por ejemplo alcoxi-PEG amina más sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) como se describe en el documento WO 97/10847 publicado el 27 de marzo de 1997, o PEG-maleimida disponible en el mercado de Nektar Technologies, San Carlos, CA (antiguamente Shearwater Polymers, Inc.). Como alternativa, pueden acoplarse grupos amino libres en el péptido (por ejemplo grupos amino épsilon en restos de lisina) con PEG *N*-hidroxisuccinimidil sustituido (PEG-NHS disponible de Nektar Technologies); o puede tiolarse con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y después acoplarse con derivados que contienen maleimida de PEG como se describe en Pedley *et al.*, *Br. J. Cancer*, 70: 1126-1130 (1994).

Muchos polímeros inertes, incluyendo pero sin limitación PEG, son adecuados para su uso en productos farmacéuticos. Véase, por ejemplo, Davis *et al.*, Biomedical Polymers: Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use, pp. 441-451 (1980). En algunas realizaciones de la invención, se usa un polímero no proteico. El polímero no proteico es normalmente un polímero sintético hidrófilo, es decir, un polímero que no se encuentra de otra manera en la naturaleza. Sin embargo, también son útiles polímeros que existen en la naturaleza y se producen por métodos recombinantes o *in vitro*, así como polímeros que se aíslan de fuentes nativas. Los polímeros de polivinilo hidrófilo quedan dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, polivinil alcohol y polivinilpirrolidona. Son particularmente útiles los polialquilen éteres tales como polietilenglicol (PEG); polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros en bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros, polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacáridos D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ácido glucurónico, ácido siálico, D-ácido galacturónico, D-ácido manurónico (por ejemplo ácido polimanurónico o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico incluyendo homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, almidón de hidroxietilo, amilasa, dextran sulfato, dextrano, dextrinas, glucógeno o la subunidad de polisacáridos de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcares tales como polisorbitol y polimanitol; heparina o heparon.

No es necesario que el polímero antes de la conjugación sea, pero preferentemente es, soluble en agua, pero el conjugado final es preferentemente soluble en agua. Preferentemente, el conjugado muestra una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,01 mg/ml y más preferentemente al menos aproximadamente 0,1 mg/ml, y aún más preferentemente al menos aproximadamente 1 mg/ml. Además, el polímero no debería ser altamente inmunogénico en la forma conjugada, ni debería poseer viscosidad que sea incompatible con la infusión intravenosa, inyección o inhalación si se pretende administrar el conjugado por dichas vías.

El peso molecular del polímero puede variar hasta aproximadamente 100.000 D, y preferentemente es de al menos aproximadamente 500 D, o al menos aproximadamente 1.000 D, o al menos aproximadamente 5.000 D. En algunas realizaciones, el PEG u otro polímero tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 20.000 D. El peso molecular elegido puede depender del tamaño efectivo del conjugado para conseguir, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificada) del polímero, y del grado de derivatización, es decir, el número de moléculas poliméricas por péptido, y el sitio o los sitios de unión a polímero en el péptido. En algunas realizaciones, pueden usarse PEG ramificados para inducir un gran aumento en el tamaño efectivo de los péptidos. Pueden utilizarse PEG u otros conjugados poliméricos para aumentar la semivida, aumentar la solubilidad, estabilizar frente a ataque proteolítico y reducir la inmunogenicidad.

Están disponibles polímeros PEG funcionalizados para modificar los péptidos de la invención de Nektar Technologies de San Carlos, CA (antiguamente Shearwater Polymers, Inc.). Dichos derivados de PEG disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, amino-PEG, PEG aminoácido ésteres, química de PEG-*N*-hidroxisuccinimida (NHS), PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, PEG aminoácidos, PEG succinimidil succinato, PEG succinimidil propionato, succinimidil éster de PEG carboximetilado, succinimidil carbonato de PEG, succinimidil ésteres de aminoácido PEG, PEG-xicarbonilimidazol, PEG-nitrofenil carbonato, PEG tresilato, PEG-glicidil éter, PEG-aldehído, PEG vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-ortopiridil-disulfuro, PEG heterofuncionales, derivados de PEG vinilo, PEG silanos, y PEG fosfólidos. Las condiciones de reacción para acoplar estos derivados de PEG variarán dependiendo de la proteína, el grado deseado de PEGilación, y el derivado de PEG utilizado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto de unión deseado (tal como grupos R de lisina o cisteína), estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, estabilidad, toxicidad y antigenicidad del enlace, conveniencia para análisis, etc. Están disponibles del fabricante instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado particular.

#### c. Caracterización de conjugados.

Los conjugados pueden caracterizarse por SDS-PAGE, filtración en gel, RMN, mapeo triptico, cromatografía líquida-espectrometría de masas, y ensayos biológicos *in vitro*. Por ejemplo, el alcance de la conjugación de PEG puede mostrarse por SDS-PAGE y filtración en gel, y después analizarse por RMN, que tiene un pico de resonancia específico para los hidrógenos de metileno de PEG. El número de grupos de PEG en cada molécula puede calcularse a partir del espectro de RMN o espectrometría de masas. La electroforesis en gel de poli(acrilamida) en SDS al 10 % se procesa apropiadamente en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM como tampón de elución. Para demostrar qué resto está PEGilado, puede realizarse mapeado triptico. Por lo tanto, los péptidos PEGilados se digieren con tripsina a la relación de proteína/enzima de 100 a 1 en mg a 37 °C durante 4 horas en acetato sódico 100 mM, Tris-HCl 10 mM, cloruro cálcico 1 mM, pH 8,3 y se acidifican a pH <4 para detener la digestión antes de separar en HPLC Nucleosilo C-18 (4,6 mm x 150 Mm, 5  $\mu$ m., 100 Å). El cromatograma se compara con el del material de partida no PEGilado. Cada pico puede analizarse después por espectrometría de masas para verificar el tamaño del fragmento en el pico. El fragmento o los fragmentos que portaban los grupos PEG no se retenían habitualmente en la columna de HPLC después de la inyección y desaparecen de la cromatografía. Dicha desaparición de la cromatografía es un indicio de PEGilación en ese fragmento particular que debería contener al menos un resto de lisina. Pueden después ensayarse péptidos PEGilados con respecto a su capacidad para unirse con el BLYS por métodos convencionales.

En algunas realizaciones, los conjugados se purifican por cromatografía de intercambio iónico, (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico). La química de muchos de los PEG activados electrofílicamente da como resultado una reducción de la carga de grupo amino del producto PEGilado. Por lo tanto, puede usarse cromatografía de intercambio iónico de alta resolución para separar las proteínas libres y conjugadas, y para resolver especies con diferentes niveles de PEGilación. De hecho, la resolución de diferentes especies (por ejemplo que contienen uno o dos restos de PEG) también es posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de los aminoácidos que no han reaccionado. En una realización, se resuelven especies con diferentes niveles de PEGilación de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 96/34015 (Solicitud Internacional N° PCT/US96/05550 publicada el 31 de octubre de 1996). Se purifican especies heterólogas de los conjugados entre sí de la misma manera.

En algunas realizaciones, PEG-*N*-hidroxisuccinimida (NHS) reacciona con una amina primaria (por ejemplo lisinas y el extremo N terminal). En algunas realizaciones, PEG-NHS reacciona con una lisina (K) C terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el resto de lisina se añade al extremo C terminal del polipéptido de 17 unidades, mientras que en otras realizaciones, X<sub>17</sub> se sustituye con lisina. En algunas realizaciones, el polímero reacciona con el extremo N terminal. En una realización preferida, el conjugado se genera utilizando los métodos de derivatización y purificación descritos en los Ejemplos posteriores.

Se desvela en el presente documento cualquiera de los conjugados anteriormente descritos formados por sus partes componentes, es decir, uno o más péptidos unidos covalentemente con una o más moléculas poliméricas, sin ninguna materia extraña en la estructura molecular covalente del conjugado.

### Producción de anticuerpos

Los métodos y artículos de fabricación desvelados en el presente documento usan, o incorporan, un anticuerpo que se une con CD20. En consecuencia, se describirán aquí y en los Ejemplos métodos para generar dichos anticuerpos.

El CD20 para usar para la producción de, o exploración con respecto a, anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del antígeno o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. La secuencia de CD20 es conocida, véase Figura 10 y Figura 11. Se describen clonación y las secuencias para CD20 humano en al menos las siguientes referencias: Stamenkovic I., Seed B., J. Exp. Med. 167, 1975-1980, 1988. "Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B 1, Bp35), a type III integral membrane protein."; Tedder T.F., Streuli M., Schlossman S.F., Saito H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-212, 1988. "Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes"; Tedder T.F., Klejman G., Schlossman S.F., Saito H., J. Immunol. 142, 2560-2568, 1989. "Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1)"; Einfeld D.A., Brown J.P., Valentine M.A., Clark E.A., Ledbetter J.A., EMBO J. 7, 711-717, 1988.: "Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domain". Los fragmentos peptídicos del dominio extracelular (ECD) pueden usarse como inmunógenos. Basándose en estas secuencias y delimitaciones de dominio conocidas, un experto en la materia puede expresar el polipéptido CD20 y fragmentos del mismo para su uso para producir anticuerpos.

Para generar anticuerpos para el CD20 humano, los restos de aminoácidos de dominio extracelular 142-188 y los fragmentos peptídicos de 6 o más restos de longitud pueden usarse como inmunógenos para inducir anticuerpos en roedores incluyendo ratones, hámsteres y ratas, en conejo, cabra u otro animal adecuado. El polipéptido CD20 soluble o fragmentos inmunogénicos del mismo puede expresarse en células hospedadoras adecuadas tales como bacterias o células eucariotas. En una realización, se producen CD20 de longitud completa solubilizados en detergente humanos y murinos en *E. coli* (véase Ejemplos posteriores) y se usan para inmunizar y explorar con respecto a hibridomas que producen anticuerpos anti-CD20.

Como alternativa, o adicionalmente, pueden usarse células B o líneas celulares que expresan CD20 en su superficie celular para generar, y/o explorar con respecto a, anticuerpos. Una de dichas líneas celulares es la línea celular de linfoblastoide humano SB (N° de referencia ATCC ATCC CCL 120, de ATCC, Rockville, Md). Los anticuerpos se generan para CD20 para el tratamiento de seres humanos. Otras formas de CD20 útiles para generar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

También puede usarse metodología de presentación de fagos para producir anticuerpo de unión a CD20.

Los anticuerpos que se unen con CD20 pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Dichos anticuerpos y métodos para generarlos se describen en más detalle posteriormente.

#### (i) Anticuerpos policlonales

Se inducen preferentemente anticuerpos policlonales en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie para inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante,

por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación mediante restos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , en la que R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

5 Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después se toman muestras sanguíneas de los animales y el suero se ensaya con respecto al título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, se usan convenientemente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

15 (ii) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no está en una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se dejan crecer en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, apoyan la producción a alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California Estados Unidos, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones también se separan convenientemente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como,

por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

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

El ADN puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o una parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina.

Normalmente dichos polipéptidos no de inmunoglobulina sustituyen a los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituyen a los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) *Anticuerpos humanizados*

Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta después como la región marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es más importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La

inspección de estas presentaciones permite análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR de las secuencias receptoras e importadas de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la modificación de la unión a antígeno.

(iv) *Anticuerpos humanos*

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de región de unión de cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras su exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos N° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en fase en un gen de proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase también, Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

También pueden generarse anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* (véase Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

(v) *Fragmentos de anticuerpo*

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse con dos epítopos diferentes del marcador de superficie de células B. Otros de dichos anticuerpos pueden unirse con un primer marcador de células B y además unirse con un segundo marcador de superficie de células B. Como alternativa, puede combinarse una rama de unión a marcador anti-células B con una rama que se una con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en las células B. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para la célula B. Estos

anticuerpos poseen una rama de unión a marcadores de células B y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón, alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopos radiactivos). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

5 Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas, (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solamente una  
10 tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

15 De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión está preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones: ADN  
20 que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes  
25 para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son de importancia particular.

30 En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este  
35 enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986). De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio  $C_H3$  de un dominio  
40 constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del  
45 heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de reticulación adecuados y se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

55 También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden de forma proteolítica anticuerpos intactos para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol arsenita sódica para estabilizar ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

65 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la

producción de una molécula F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron con las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita en Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. También se ha indicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Se contemplan una modificación o modificaciones de secuencias de aminoácidos de antagonistas y anticuerpos proteicos o peptídicos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo o antagonista de unión a CD20. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del antagonista introduciendo cambios de nucleicos apropiados en el ácido nucleico antagonista, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del antagonista. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales del antagonista, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del antagonista que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido con carga negativa o neutro (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencias de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de exploración de ala o aleatoria en el codón o región diana y las variantes de antagonistas expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un antagonista con un resto metionilo N terminal o el antagonista fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula antagonista incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del antagonista de una enzima, o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del antagonista.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula antagonista reemplazada por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución de antagonistas de anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos y explorarse los productos.

**Tabla 1**

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
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	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del antagonista seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes:

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

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de uno de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del antagonista también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al antagonista para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el antagonista es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental. En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución es la maduración de afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se ha descrito en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Otro tipo de variante de aminoácido del antagonista altera el patrón de glucosilación original del antagonista. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en el antagonista y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el antagonista.

La glucosilación de polipéptidos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares *N*-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al antagonista se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del antagonista (para sitios de glucosilación ligados a O).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del antagonista por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis por casete de una versión variante o no variante previamente preparada del antagonista.

Puede ser deseable modificar el antagonista de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del antagonista. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo antagonista. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de internacionalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase, Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. *Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral potenciada usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describen en Wolff *et al.* *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener por lo tanto lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del antagonista, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el antagonista (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

## Ensayos

Las concentraciones de células B periféricas se determinan por un método de FACS que recuenta la células CD3-/CD40+. El porcentaje de células B CD3-CD40+ de linfocitos totales en muestras puede obtenerse por la siguiente estrategia de selección. La población de linfocitos se marca en el diagrama de dispersión de dispersión frontal/dispersión lateral para definir la Región 1 (R1). Usando acontecimientos en R1, se presentan las gráficas de puntos de intensidad de fluorescencia para los marcadores de CD40 y CD3. Se usan controles de isotipos marcados con fluorescencia para determinar los puntos de corte respectivos para la positividad para CD40 y CD3.

### Análisis de FACS

Se lavan medio millón de células y se resuspenden en 100 µl de tampón FACS, que es solución salina tamponada con fosfato con BSA al 1 %, que contiene 5 µl de anticuerpo de tinción o de control. Todos los anticuerpos de tinción, incluyendo controles de isotipo, se obtienen de PharMingen, San Diego, CA. Se evalúa la expresión de CD20 humano tiñendo con Rituxan® junto con anticuerpo secundario anti-IgG1 humano conjugado con FITC. Se realiza análisis de FACS usando FACScan y Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Todos los linfocitos se definen en las dispersiones de luz frontal y lateral, mientras que todos los linfocitos B se definen con la expresión de B220 en la superficie celular.

Se evalúa el agotamiento de células B y su recuperación analizando recuentos de células B periféricas y análisis de células B hCD20+ por FACS en el bazo, ganglio linfático y médula ósea diariamente durante la primera semana después de la inyección y a continuación semanalmente. Se controlan los niveles en suero del anticuerpo variante 2H7 inyectado.

### Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos de unión a CD20 usados de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metilo o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como olivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehasola o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

Se describen formulaciones de anticuerpo anti-CD20 ejemplares en el documento WO98/56418. Otra formulación es una formulación multidosis líquida que comprende el anticuerpo anti-CD20 a 40 mg/ml, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico 0,9 %, polisorbato 20 0,02 %, a pH 5,0 que tiene un periodo de validez mínimo de dos años de almacenamiento a 2-8 °C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende anticuerpo 10 mg/ml en cloruro sódico 9,0 mg/ml, citrato sódico dihidrato 7,35 mg/ml, polisorbato 80 0,7 mg/ml y Agua Estéril para inyección, pH 6,5. Otra formulación farmacéutica acuosa más comprende acetato sódico 10-30 mM de aproximadamente pH 4,8 a aproximadamente pH 5,5, preferentemente a pH 5,5, polisorbato como un tensioactivo en una cantidad de aproximadamente 0,01-0,1 % v/v, trehalosa en una cantidad de aproximadamente 2-10 % p/v, y alcohol bencílico como un conservante (documento U.S. 6.171.586). Se describen formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea en el documento WO97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado hasta una concentración de proteína alta y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero para tratar en el presente documento.

Una formulación para las variantes de 2H7 humanizadas es el anticuerpo a 12-14 mg/ml en histidina 10 mM, sacarosa 6 %, polisorbato 20 0,02 %, pH 5,8. En una realización específica, se formulan variantes de 2H7 y en particular 2H7.v16 a 20 mg/ml de anticuerpo en sulfato de histidina 10 mM, sacarosa 60 mg/ml, polisorbato 20 0,2 mg/ml y Agua Estéril para Inyección, a pH 5,8.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente las que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, citocina o agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúa en células T, tales como ciclosporina o un anticuerpo que se une con células T, por ejemplo, uno que se une con LFA-1). La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta el momento.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 3.773.919), copolímeros de L-ácido glutámico y etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxitúrico.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

## Tratamiento de enfermedad

### Enfermedades

- 5 Los anticuerpos de unión a CD20 y antagonistas de BLYS desvelados en el presente documento son útiles para tratar tumores malignos de células B y trastornos autoinmunitarios regulados por células B.

Las enfermedades autoinmunitarias reguladas por células B incluyen artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), psoriasis, dermatitis incluyendo dermatitis atópica; urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, necrolisis epidérmica tóxica, esclerodermia sistémica y esclerosis, respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), meningitis, rinitis alérgica, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eccema, asma, afecciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus (incluyendo nefritis, no renal, discoide, alopecia), diabetes de aparición juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo ANCA), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, Anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, aplasia de glóbulos rojos pura (AGRP), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de múltiples órganos, miastenia grave, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal anti-glomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolipídico, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, Síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplantes de órganos sólidos (incluyendo pretratamiento para títulos de anticuerpos altamente reactivos al panel, depósito de IgA en tejidos, etc.), enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), penfigoide ampoloso, pénfigo (todos incluyendo vulgar, foliáceo), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis de complejo inmunitario, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunitaria, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo I también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial Linfoide (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, Síndrome de Guillain-Barre, Vasculitis de Vasos Grandes (incluyendo Polimialgia Reumática y Arteritis de Células Gigantes (de Takayasu)), Vasculitis de Vasos Medianos (incluyendo Enfermedad de Kawasaki y Poliarteritis Nodosa), espondilitis anquilosante, Enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), Glomerulonefritis de Progresión Rápida, cirrosis biliar primaria, esprúe Celiaco (enteropatía de gluten), crioglobulinemia, ALS, enfermedad de las arterias coronarias.

Las neoplasias de células B incluyen enfermedad de Hodgkin CD20-positiva incluyendo enfermedad de Hodgkin con linfocitos predominantes (LPHD); linfoma no de Hodgkin (NHL), linfomas de células del centro folicular (FCC); leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia de tricoleucitos. El linfoma no de Hodgkin incluye linfoma no de Hodgkin folicular/de grado bajo (NHL), NHL linfocítico pequeño (SL), NHL folicular/de grado intermedio, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma linfocítico plasmacitoide, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom. También se contempla el tratamiento de recaídas de estos cánceres. LPHD es un tipo de enfermedad de Hodgkin que tiende a recaer frecuentemente a pesar del tratamiento con radiación o quimioterapia y se caracteriza por células malignas CD20 positivas. CLL es uno de cuatro tipos principales de leucemia. Un cáncer de células B maduras denominadas linfocitos, CLL se manifiesta por acumulación progresiva de células en sangre, médula ósea y tejidos linfáticos. El linfoma indolente es una enfermedad incurable, de crecimiento de lento en la que el paciente promedio sobrevive entre seis y 10 años después de numerosos periodos de remisión y recaída.

Los antagonistas de BLYS y anticuerpos de unión a CD20 pueden usarse para tratar linfoma no de Hodgkin (NHL), enfermedad de Hodgkin con linfocitos predominantes (LPHD), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL) que es un tipo de linfoma no de Hodgkin (NHL), artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (SLE), incluyendo nefritis lúpica, enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía de IgA, polineuropatías IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren y glomerulonefritis.

65 El nivel deseado de agotamiento de células B dependerá de la enfermedad. Para el tratamiento de un cáncer CD20 positivo, puede ser deseable maximizar el agotamiento de las células B que son la diana de los anticuerpos anti-

CD20 de la invención. Por lo tanto, para el tratamiento de una neoplasia de células B CD20 positiva, es deseable que el agotamiento de células B sea suficiente para evitar al menos la progresión de la enfermedad que puede evaluarse por el médico experto en la materia, por ejemplo, controlando el crecimiento tumoral (tamaño), proliferación del tipo de célula cancerosa, metástasis, otras señales y síntomas del cáncer particular. Preferentemente, el agotamiento de células B es suficiente para evitar la progresión de enfermedad durante al menos 2 meses, más preferentemente 3 meses, aún más preferentemente 4 meses, más preferentemente 5 meses, aún más preferentemente 6 o más meses. En realizaciones aún más preferidas, el agotamiento de células B es suficiente para aumentar el tiempo en remisión en al menos 6 meses, más preferentemente 9 meses, más preferentemente un año, más preferentemente 2 años, más preferentemente 3 años, aún más preferentemente 5 o más años. En una realización más preferida, el agotamiento de células B es suficiente para curar la enfermedad. En realizaciones preferidas, el agotamiento de células B en un paciente de cáncer es al menos aproximadamente 75 % y más preferentemente, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % e incluso 100 % del nivel de línea basal antes del tratamiento.

Para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, puede ser deseable modular el alcance del agotamiento de células B dependiendo de la enfermedad y/o la gravedad de la afección en el paciente individual, ajustando la dosificación del anticuerpo de unión a CD20. Por lo tanto, el agotamiento de células B puede ser, pero no es necesario que sea completo. Por otro lado, puede desearse el agotamiento de células B total en el tratamiento inicial pero en tratamientos posteriores, la dosificación puede ajustarse para conseguir solamente agotamiento parcial. En una realización, el agotamiento de células B es de al menos el 20 %, es decir, 80 % o menos de células B CD20 positivas permanecen en comparación con el nivel de línea basal antes del tratamiento. En otras realizaciones, el agotamiento de células B es del 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o más. Preferentemente, el agotamiento de células B es suficiente para detener la progresión de la enfermedad, más preferentemente para aliviar las señales y síntomas de la enfermedad particular en tratamiento, aún más preferentemente para curar la enfermedad.

Las publicaciones con respecto a la terapia con Rituximab incluyen: Perotta y Abuel "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab" Resúmen N° 3360 Blood 10(1) (parte 1-2): p. 88B (1998); Stashi *et al.* "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" Blood 98(4): 952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" New Scientist (7 Abril, 2001); Leandro *et al.* "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis 61 833-888 (2002); Leandro *et al.* "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro *et al.* "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis & Rheumatism 46(1): 2673-2677 (2002); Edwards y Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" Rheumatology 40: 205-211 (2001); Edwards *et al.* "B lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" Biochem. Soc. Trans. 30(4): 824-828 (2002); Edwards *et al.* "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 46(9): S 197 (2002); Levine y Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" Neurology 52: 1701-1704 (1999); DeVita *et al.* "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" Arthritis & Rheum 46: 2029-2033 (2002); Hidashida *et al.* "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 24-29 oct; Nueva Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Influximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 24-29 oct; Nueva Orleans, LA 2002.

Para aplicaciones terapéuticas, las composiciones de anticuerpo anti-CD20 y antagonista de BLYS pueden usarse en terapia de combinación con, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, hormonas, antiangiógenos, compuestos radiomarcados o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Los métodos de tratamiento precedente pueden administrarse junto con otras formas de terapia convencional, bien consecutivamente con, pre o post-terapia convencional. El anticuerpo anti-CD20 y antagonista de BLYS se administrarán con una dosis terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico. En otra realización, el anticuerpo anti-CD20 y antagonista de BLYS se administran junto con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. El Physicians' Desk Reference (PDR) desvela dosificaciones y agentes quimioterapéuticos que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se trate, el alcance de la enfermedad y otros factores con los que está familiarizado el médico experto en la materia y pueden determinarse por el médico.

Un paciente se alivia o se trata con éxito de una neoplasia de células B o enfermedades autoinmunitarias reguladas por células B por los presentes métodos de la invención si hay una mejora medible en los síntomas u otros criterios aplicables después de la administración de las composiciones de la invención en comparación con antes del tratamiento. El efecto del tratamiento puede resultar evidente en un intervalo de 3-10 semanas después de la administración de las composiciones de la invención. Los criterios aplicables para cada enfermedad se conocerán bien por el médico experto en la materia apropiada. Por ejemplo, el médico puede controlar al paciente tratado con respecto a pruebas clínicas, o serológicas, de enfermedad tales como marcadores serológicos de enfermedad, recuento de sangre completa incluyendo recuento de células B, y niveles de inmunoglobulina en suero. Los niveles

en suero de IgG e IgM se reducen en ratones tratados con BR3-Fc. Se espera que los pacientes humanos que responden al tratamiento con BR3-Fc o anticuerpo anti-CD20 o ambos muestren de forma similar una reducción en los niveles de IgG e IgM en suero. El paciente puede mostrar reducción observable y/o medible en o en ausencia de uno o más de los siguientes: reducción del número de células cancerosas o ausencia de las células cancerosas; reducción del tamaño tumoral; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferentemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos; inhibición (es decir, ralentización en algún grado y preferentemente detención) de metástasis tumoral; inhibición, en algún grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio en algún grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad, y mejora de problemas de la calidad de vida. Preferentemente, después de la administración de las composiciones de la invención, la mejora es de al menos el 20 % sobre la línea basal para un síntoma particular o criterio tomado antes del tratamiento por los métodos de la invención, más preferentemente, 25-30 %, aún más preferentemente 30-35 %, más preferentemente 40 % y superior.

Los parámetros para evaluar la eficacia o éxito del tratamiento de la neoplasia se conocerán por el médico experto en la enfermedad apropiada. En general, el médico experto buscará la reducción de las señales y síntomas de la enfermedad específica. Los parámetros pueden incluir la mediana del tiempo hasta progresión de la enfermedad, tiempo en remisión y enfermedad estable. Para neoplasias de células B, los criterios medibles pueden incluir, por ejemplo, tiempo hasta progresión de la enfermedad, un aumento de la duración de supervivencia general y/o sin progresión. En el caso de leucemia, puede realizarse una biopsia de médula ósea para determinar el grado de remisión. La remisión completa puede definirse como las células de leucemia que componen menos del 5 por ciento de todas las células halladas en la médula ósea de un paciente 30 días después del tratamiento.

Las referencias siguientes describen linfomas y CLL, sus diagnósticos, tratamiento y procedimientos médicos convencionales para medir la eficacia del tratamiento. Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL: *The Lymphomas*. W.B.Saunders Company, Filadelfia, 1998; van Besien K y Cabanillas, F: *Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma*, Cap. 70, pp 1293-1338, en: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3ª ed. Hoffman *et al.* (editores). Churchill Livingstone, Filadelfia, 2000; y Rai, K y Patel, D: *Chronic Lymphocytic Leukemia*, Cap. 72, pp 1350-1362, en: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3ª ed. Hoffman *et al.* (editores). Churchill Livingstone, Filadelfia, 2000.

Los parámetros para evaluar la eficacia o el éxito del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o relacionada con la autoinmunidad se conocerán por el médico experto en la enfermedad apropiada. En general, el médico experto buscará la reducción de las señales y síntomas de la enfermedad específica. Los siguientes son ejemplos.

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario de etiología desconocida. La mayoría de los pacientes con AR padecen una evolución crónica de la enfermedad que, incluso con terapia, puede dar como resultado destrucción progresiva de las articulaciones, deformidad, discapacidad e incluso muerte prematura. Los objetivos de la terapia de AR son prevenir o controlar el daño a las articulaciones; prevenir la pérdida de función y reducir el dolor. La terapia inicial de AR implica habitualmente la administración de uno o más de los siguientes fármacos: fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), glucocorticoides (mediante inyección en las articulaciones) y prednisona de dosis baja. Véase "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheumatism* 46(2): 328-346 (febrero, 2002). La mayoría de los pacientes con AR de nuevo diagnóstico comienzan la terapia de fármaco antirreumático modificador de enfermedad (ARMD) en un periodo de 3 meses desde el diagnóstico. Son ARMD habitualmente usados en AR la hidroxicloroquina, sulfasalizina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), azatioprina, D-penicilamina, Oro (oral), Oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, inmunoadsorción de proteína A Estafilocócica.

Debido a que el cuerpo produce factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) durante la AR, se han usado inhibidores de TNF $\alpha$  para terapia de esa enfermedad. Etanercept (ENBREL®) es un fármaco inyectable aprobado en Estados Unidos para la terapia de AR activa. Etanercept se une con TNF $\alpha$  y actúa para retirar la mayoría de TNF $\alpha$  de las articulaciones y la sangre, evitando de esta manera que TNF $\alpha$  promueva la inflamación y otros síntomas de artritis reumatoide. El Etanercept es una proteína de fusión de "inmunoadhesina" que consiste en la parte de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kD (p75) humano unido con la parte Fc de un IgG1 humano. Infliximab, que se vende con el nombre comercial REMICADE®, es un fármaco supresor inmunitario prescrito para tratar la AR y enfermedad de Crohn. Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une con TNF $\alpha$  y reduce la inflamación en el cuerpo dirigiéndose a y uniéndose con TNF $\alpha$  que produce inflamación.

Adalimumab (HUMIRA™, Abbott Laboratories), previamente conocido como D2E7, es un anticuerpo monoclonal humano que se une con TNF $\alpha$  y está aprobado para reducir las señales y síntomas e inhibir la progresión de daño estructural en adultos con AR de moderada a gravemente activa que han tenido una respuesta insuficiente a uno o más ARMD modificadores de enfermedad tradicionales.

El tratamiento de la artritis reumatoide administrando un anticuerpo anti-CD20 y un antagonista de BLYS puede preformarse junto con terapia con uno o más de los fármacos anteriormente mencionados para AR.

Para artritis reumatoide, por ejemplo, las mediciones para el progreso en el tratamiento pueden incluir el número de articulaciones hinchadas y dolorosas y la duración de la rigidez matutina. Los pacientes pueden examinarse con respecto a cuánto se han erosionado las articulaciones en las manos y en los pies usando rayos X y un sistema de puntuación conocido como la puntuación de Sharp. Otro sistema de puntuación se basa en los criterios del Colegio de Reumatología Americano para evaluar la respuesta a terapias.

Un método para evaluar la eficacia del tratamiento en AR se basa en los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), que mide el porcentaje de mejora en articulaciones dolorosas e inflamadas, entre otras cosas. El paciente con AR puede puntuarse a, por ejemplo, ACR 20 (20 por ciento de mejora) en comparación con sin tratamiento de anticuerpos (por ejemplo, línea basal antes del tratamiento) o tratamiento con placebo. Otras maneras de evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpos incluyen la puntuación de rayos X tales como la puntuación de rayos X de Sharp usada para puntuar el daño estructural tal como erosión ósea y estrechamiento del espacio de las articulaciones. Los pacientes también pueden evaluarse con respecto a la prevención de o mejora en la discapacidad basándose en la puntuación del Cuestionario de Evaluación de Salud [HAQ], puntuación AIMS, SF-36 en períodos de tiempo durante o después del tratamiento. Los criterios de ACR 20 pueden incluir 20 % de mejora tanto en el recuento de articulaciones dolorosas como en el recuento de articulaciones inflamadas más una mejora del 20 % en al menos 3 de 5 medidas adicionales:

1. evaluación del dolor del paciente por escala visual analógica (VAS),
2. evaluación global del paciente de actividad de enfermedad (VAS),
3. evaluación global del médico de la actividad de enfermedad (VAS),
4. discapacidad autoevaluada por el paciente medida por el Cuestionario de Evaluación de la Salud, y
5. pacientes que reaccionan en fase aguda, CRP o ESR.

El ACR 50 y 70 se definen de forma análoga. Preferentemente, se administra al paciente una cantidad de un anticuerpo de unión a CD20 de la invención eficaz para conseguir al menos una puntuación de ACR 20, preferentemente al menos ACR 30, más preferentemente al menos ACR50, aún más preferentemente al menos ACR70, más preferentemente al menos ACR 75 y superior.

La artritis psoriásica tiene características radiográficas únicas y definidas. Para la artritis psoriásica, puede evaluarse la erosión de las articulaciones y estrechamiento del espacio de las articulaciones también por la puntuación de Sharp. Los anticuerpos de unión a CD20 humanizados desvelados en el presente documento pueden usarse para prevenir el daño de las articulaciones así como reducir las señales de enfermedad y síntomas del trastorno.

Otro aspecto más de la invención es un método para tratar Lupus o SLE administrando al paciente que padece SLE, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a CD20 humanizado de la invención. Las puntuaciones de SLEDAI proporcionan una cuantificación numérica de la actividad de la enfermedad. El SLEDAI es un índice ponderado de 24 parámetros clínicos y de laboratorio que se sabe que se correlacionan con la actividad de enfermedad, con un intervalo numérico de 0-103. Véase Bryan Gescuk y John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" en Current Opinion in Rheumatology 2002, 14: 515-521. Se cree que los anticuerpos para ADN bicatenario provocan brotes renales y otras manifestaciones de lupus. Los pacientes que se someten a tratamiento con anticuerpos pueden controlarse con respecto al tiempo hasta brote renal, que se define como un aumento significativo, reproducible, de la creatinina en suero, proteína en orina o sangre en la orina. Como alternativa o además, los pacientes pueden controlarse con respecto a los niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos para ADN bicatenario. Los tratamientos para SLE incluyen corticosteroides de alta dosis y/o ciclofosfamida (HDCC).

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos de las articulaciones, que incluyen espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y enfermedad de Crohn. El éxito del tratamiento puede determinarse por herramientas de medición de evaluación global por el paciente y el médico validadas.

Para lupus eritematoso sistémico, los pacientes pueden controlarse con respecto a niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos para ADN bicatenario.

Se usan diversas medicaciones para tratar la psoriasis; el tratamiento difiere directamente en relación con la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con una forma más leve de psoriasis normalmente utilizan tratamientos, tales como esteroides tópicos, antralina, calcipotrieno, clobetasol y tazaroteno, para controlar la enfermedad mientras que los pacientes con psoriasis moderada y grave tienen más probabilidades de emplear terapias sistémicas (metotrexato, retinoides, ciclosporina, PUVA y UVB). También se usan alquitranes. Estas terapias tienen una combinación de preocupaciones de seguridad, regímenes que consumen tiempo o procesos de tratamiento inconvenientes. Además, algunos requieren equipamiento caro y espacio dedicado en el ambiente de oficina. Las medicaciones sistémicas pueden producir graves efectos secundarios, incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, supresión de médula ósea, enfermedad hepática, enfermedad renal y trastorno gastrointestinal. Además, el uso de fototerapia pueda aumentar la incidencia de cánceres cutáneos. Además de la inconveniencia e incomodidad asociada con el uso de terapias tópicas, la fototerapia y los tratamientos sistémicos requieren el paso de los pacientes por etapas con terapia y sin terapia y el control de la exposición en el tiempo de vida debido a sus efectos

secundarios.

La eficacia del tratamiento para psoriasis se evalúa controlando los cambios en las señales clínicas y síntomas de la enfermedad incluyendo cambios en la Evaluación Global del Médico (PGA) y las puntuaciones del Índice de Área y Gravedad de Psoriasis (PASI), Evaluación de los Síntomas de Psoriasis (PSA), en comparación con la condición de línea basal. El paciente puede medirse periódicamente durante todo el tratamiento en la escala analógica visual usada para indicar el grado de prurito experimentado en puntos temporales específicos.

#### *Dosificación*

Dependiendo de la indicación para tratar y los factores relevantes para la dosificación con los que estaría familiarizado un médico experto en el campo, los antagonistas de BLYS y anticuerpos de unión a CD20 de la invención se administrarán a una dosificación que es eficaz para el tratamiento de esa indicación minimizando al mismo tiempo la toxicidad y los efectos secundarios. Para el tratamiento de pacientes que padecen neoplasia de células B tales como linfoma no de Hodgkin en una realización específica, los anticuerpos anti-CD20 de la invención se administrarán a un paciente humano en un intervalo de dosificación de 1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente a 2,5 mg/kg hasta 10 mg/kg. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CD20 se administra a una dosificación de 10 mg/kg o 375 mg/m<sup>2</sup>. Para el tratamiento de NHL, un régimen de dosificación sería administrar 375 mg/m<sup>2</sup> de anticuerpo anti-CD20 cada dos semanas para 2-4 dosis, o una dosis de la composición de anticuerpo en la primera semana de tratamiento, seguido de un intervalo de 2 semanas, después se administra una segunda dosis de la misma cantidad de anticuerpo. En general, los pacientes con NHL reciben dicho tratamiento una vez durante un año pero tras la reaparición del linfoma, dicho tratamiento puede repetirse. En el tratamiento de NHL, el anticuerpo anti-CD20 más terapia con antagonista de BLYS pueden combinarse con quimioterapia tal como con CHOP. En otra realización, para el tratamiento de neoplasias de células B tales como CLL o SLL, los pacientes pueden recibir cuatro dosis semanales de Rituxan a 375 mg/m<sup>2</sup> después o antes de la administración con BR3-Fc con CLL recidivante. Para CLL, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 y antagonistas de BLYS puede combinarse con quimioterapia, por ejemplo, con fludarabina y citoxan.

Para el tratamiento de artritis reumatoide, en una realización, Rituxan<sup>™</sup> que es un anticuerpo quimérico se administra a 500 mg por dosis cada dos semanas para un total de 2 dosis. Un anticuerpo anti-CD20 humanizado, por ejemplo, hu2H7v.16 o cualquier variante de hu 2H7 como se desvela en el presente documento, puede administrarse a menos de 500 mg por dosis tal como entre aproximadamente 200-500 mg por dosis, entre aproximadamente 250 mg-450 mg, o 300-400 mg por dosis, para 2-4 dosis cada dos semanas o cada 3 semanas.

Puede administrarse Br3-Fc a un intervalo de dosificación de 0,5 mg/kg a 10 mg/kg, preferentemente de 1 mg/kg a 5 mg/kg, más preferentemente, de 1,5 mg/kg a 2,5 mg/kg. En una realización, se administra BR3-Fc a 5 mg/kg cada dos días del día 1 al día 12 de tratamiento. También se contempla la dosificación a aproximadamente 2-5 mg/kg cada 2-3 días para un total de 2-5 dosis.

Los métodos de tratamiento comprenden una combinación de administración simultánea y secuencial del anticuerpo anti-CD20 y el antagonista de BLYS (ambos denominados en el presente documento fármacos). En administración secuencial, los fármacos pueden administrarse en cualquier orden, es decir, antagonista de BLYS en primer lugar seguido de anticuerpo anti-CD20. El paciente se trata con un fármaco y se controla con respecto a eficacia antes del tratamiento con el fármaco. Por ejemplo, si el antagonista de BLYS produce una respuesta parcial, el tratamiento puede seguirse del anticuerpo anti-CD20 para conseguir una respuesta completa, y viceversa. El BR3-Fc que es una inmunoadhesina tiene una mitad más corta en comparación con un anticuerpo anti-CD20 de longitud completa. Para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, si el anticuerpo anti-CD20 es Rituxan y el antagonista del BLYS es BR3-Fc, en una realización preferida, el paciente que lo necesite recibe BR3-Fc antes del tratamiento con Rituxan. Como alternativa, puede administrarse inicialmente al paciente ambos fármacos y la dosificación posterior puede ser con solamente uno o el otro fármaco.

Para acondicionar al paciente para que tolere los fármacos y/o reduzca la aparición de efectos adversos tales como síntomas relacionados con infusión que surgen de las administraciones inicial y posterior del compuesto terapéutico, puede administrarse al mamífero que lo necesite una dosis de acondicionamiento primera o inicial de uno o ambos fármacos y administrarse después al menos una segunda dosis terapéuticamente eficaz de uno o ambos fármacos en el que la segunda y cualquier dosis posterior son mayores que la primera dosis. La primera dosis sirve para acondicionar al mamífero para que tolere la segunda dosis terapéutica más alta. De esta manera, el mamífero puede tolerar dosis mayores del compuesto terapéutico de lo que podría administrarse inicialmente. Una "dosis de acondicionamiento" es una dosis que atenúa o reduce la frecuencia o la gravedad de los efectos secundarios adversos de la primera dosis con la administración de un compuesto terapéutico. La dosis de acondicionamiento puede ser una dosis terapéutica, una dosis subterapéutica, una dosis sintomática o una dosis subsintomática. Una dosis terapéutica es una dosis que muestra un efecto terapéutico en el paciente y una dosis subterapéutica es una dosis que no muestra un efecto terapéutico en el paciente tratado. Una dosis sintomática es una dosis que induce al menos un efecto adverso en la administración y una dosis subsintomática es una dosis que no induce un efecto adverso. Algunos efectos adversos son fiebre, cefalea, náuseas, vómitos, dificultades en la respiración, mialgia y escalofríos.

*Vía de administración*

Los antagonistas de BLyS y los anticuerpos anti-CD20 se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intra-articular, intrasnovial, intratecal o inhalación. El anticuerpo anti-CD20 se administrará en general por administración intravenosa o subcutánea. Los fármacos pueden administrarse por la misma o diferente vía.

**Artículos de fabricación y kits**

Se desvela en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un antagonista de BLyS y un anticuerpo anti-CD20 útil para el tratamiento de un tumor maligno basado en células B o un trastorno autoinmunitario regulado por células B desvelado anteriormente. En una realización específica, el artículo de fabricación contiene el BR3-Fc de SEC ID 2, y el anticuerpo hu2H7v.16, para el tratamiento de linfoma no de Hodgkin.

El artículo de fabricación comprende al menos un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de la invención que es eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de unión a CD20 de la invención tal como Rituxan™ o hu2H7v.16, y el otro agente activo es un antagonista de BLyS tal como BR3-Fc. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección particular, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin o artritis reumatoide. La etiqueta o el prospecto comprenderán además instrucciones para administrar la composición al paciente. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFJ), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células B. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-CD20 y un antagonista de BLyS de la invención. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso pretendido *in vitro* o de diagnóstico.

**Ejemplos experimentales****Ejemplo 1***Desarrollo de anticuerpos monoclonales para CD20*

Se hiperinmunizaron seis ratones Balb/c, tres ratas Lewis (Charles River Laboratories, Hollister, CA) y tres hámsteres armenios (Cytogen Research and Development, Inc., Boston, MA) con células 293 humanas infectadas por adenovirus que expresaban de forma transitoria CD20 murino (Genentech, Inc., South San Francisco, CA), en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se administraron refuerzos pre-fusión, consistentes en células murinas que expresaban niveles endógenos de CD20 y mCD20 recombinante purificado expresado en *E. coli* (Genentech, Inc., South San Francisco, CA), tres días antes de la fusión. Las células B de todos los animales se fusionaron con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) usando un protocolo modificado análogo a uno previamente descrito (Kohler y Milstein, 1975; Hongo *et al.*, 1995). Después de 10-14 días, los sobrenadantes de las fusiones de ratón y hámster se recogieron y se exploraron con respecto a producción de anticuerpo anti-CD20 murino y anti-CD20 humano por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) directo. La exploración de ELISA de mCD20 identificó 59 hibridomas positivos de la fusión de hámster (2 con reacción cruzada con hCD20) y 1 hibridoma positiva de la fusión de ratón (que reacciona de forma cruzada con hCD20). Se inyectan clones positivos, que muestran la mayor inmunounión después de subclonar por dilución limitante, en ratones sensibilizados con Pristano (Freund y Blair, 1982) para la producción *in vivo* de Mab o se cultivan *in vitro*. El líquido ascítico y/o los sobrenadantes se agrupan y se purifican por cromatografía de afinidad (cromatografía líquida de proteínas rápida [FPLC] de Pharmacia; Pharmacia; Uppsala, Suecia) como se ha descrito previamente (Hongo *et al.*, 1995) o usando una versión modificada del protocolo previamente descrito. Las preparaciones de anticuerpos purificadas se esterilizan por filtración (tamaño de poro de 0,2 µm, Nalgene, Rochester NY) y se almacenan a 4 °C en PBS.

ELISA directo para la evaluación de sueros inmunitarios

Se recubrieron placas de microtitulación (NUNC) con 100 µl/pocillo de CD20 murino o humano (1 µg/ml; Genentech, Inc., South San Francisco, CA) en tampón de carbonato 0,05 M, pH 9,6. Las placas recubiertas se lavaron tres veces con tampón de lavado ELISA (PBS/ Tween 20 0,05 %) y se bloquearon durante al menos 1 h con PBS que contenía albúmina de suero bovina 0,5 % y Tween 20 0,05 % (PBS/BSA/T20). Después se retiró el tampón de bloqueo y se añadieron 100 µl de muestras diluidas y controles y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después y se añadió conjugado anti-IgG específico de especie conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (Sigma, St. Louis, MO o ICN Cappel, Durham, NC) (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se incubaron con sustrato de tetrametilbenzidina (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) durante 5-10 minutos seguido de la adición de Solución de Terminación (100 µl/pocillo; BioFX Laboratories). Las placas se eluyeron después usando un lector de placas automático (EL808, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT).

**Referencias:**

Hongo, J.S., Mora-Worms, M., Lucas, C. y Fendly, B.M.: Development and characterization of murine monoclonal antibodies to the latency-associated peptide of transforming growth factor β1. *Hybridoma* 1995; 14: 253-260.  
 Kohler, G. y Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.  
 Freund YR y Blair PB: Depression of natural killer activity and mitogen responsiveness in mice treated with pristane. *J Immunol* 1982; 129: 2826-2830.

**Ejemplo 2**

**Humanización de anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 2H7**

La humanización del anticuerpo murino anti-CD20 humano, 2H7 (también denominado en el presente documento m2H7, m por murino), se llevó a cabo en una serie de etapas de mutagénesis dirigida. Los restos de CDR de 2H7 se identificaron comparando la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de 2H7 murinos (desvelados en el documento U.S. 5.846.818) con las secuencias de anticuerpos conocidos (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, Ed. 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones CDR para las cadenas pesada y ligera se definieron basándose en la hipervariabilidad de secuencia (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente) y se muestran en la Fig. 12 y Fig. 13, respectivamente. Usando oligonucleótidos sintéticos (Tabla 2), se usó mutagénesis dirigida (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 488-492 (1985)) para introducir las seis regiones CDR de 2H7 murino en un marco conservado de Fab humano completo correspondiente a una secuencia consenso V<sub>κ</sub>I, V<sub>H</sub>III (V<sub>L</sub> kappa subgrupo I, V<sub>H</sub> subgrupo III) contenido en el plásmido pVX4. El fagémido pVX4 se usó para mutagénesis así como para expresión de F(ab) en *E. coli*. Basándose en el fagémido pb0720, un derivado de pB0475 (Cunningham *et al.*, Science 243: 1330-1336 (1989)), pVX4 contiene un fragmento de ADN que codifica un anticuerpo de cadena ligera κ subgrupo I consenso humanizada (V<sub>L</sub>κI-C<sub>L</sub>) y una cadena pesada subgrupo III consenso humanizada (V<sub>H</sub>III-C<sub>H</sub>1) anti-IFN-α (interferón α). pVX4 también tiene un promotor de fosfatasa alcalina y secuencia Shine-Dalgarno ambos derivados de otro plásmido basado en pUC119 previamente descrito, pAK2 (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992)). Se introdujo un único sitio de restricción SpeI entre el ADN que codifica las cadena ligera y pesada de F(ab). Los primeros 23 aminoácidos en las cadenas tanto pesada como ligera anti-IFN-α son la secuencia de señal de secreción StII (Chang *et al.*, Gene 55: 189-196 (1987)).

Para construir la versión con intercambio de CDR de 2H7 (2H7.v2), se realizó mutagénesis dirigida en un molde que contiene desoxiuridina de pVX4; las seis CDR de anti-IFN-α se cambiaron a las CDR de 2H7 murino. La molécula resultante se denomina 2H7 humanizada versión 2 (2H7.v2), o la "versión con intercambio de CDR" de 2H7; tiene los restos de CDR m2H7 con los restos de FR humanos consenso mostrados en las Figuras 12 y 13. Se usó 2H7.v2 humanizado para humanización adicional.

La Tabla 2 muestra la secuencia oligonucleotídica usada para crear cada una de las CDR de 2H7 murino (m2H7) en la cadena H y L. Por ejemplo, el oligonucleótido de CDR-H1 se usó para recrear la CDR1 de cadena H de m2H7. CDR-H1, CDRH2 y CDR-H3 se refieren a las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena H, respectivamente; de forma similar, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 se refieren a cada una de las CDR de cadena L. Las sustituciones en CDR-H2 se realizaron en dos etapas con dos oligonucleótidos, CDR-H2A y CDR-H2B.

**Tabla 2.** Secuencias oligonucleotídicas usadas para construcción del intercambio de CDR de CDR de 2H7 murino en un marco conservado humano en pVX4. Los restos cambiados por cada oligonucleótido están subrayados.

Sustitución	Secuencia oligonucleotídica
CDR-H1	C TAC ACC TTC ACG <u>AGC</u> TAT <u>AAC ATG</u> CAC TGG GTC CG (SEC ID N <sup>o</sup> .)

CDR-H2A	<b>G ATT AAT CCT GAC <u>AAC GGC GAC ACG AGC</u> TAT AAC CAG <u>AAG TTC AAG GGC CG</u></b> (SEC ID Nº _)
CDR-H2B	GAA TGG GTT GCA <u>GCG</u> ATC TAT CCT <u>GGC</u> AAC GGC GAC AC (SEC ID Nº. _)
CDR-H3	<b>AT TAT TGT GCT CGA <u>GTG GTC TAC TAT AGC AAC AGC TAC TGG TAC TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA</u></b> (SEC ID Nº _)
CDR-L1	C TGC ACA GCC AGC <u>TCT</u> TCT <u>GTC</u> AGC TAT ATG CAT TG (SEQ ID NO. _)
CDR-L2	AA CTA CTG ATT TAC <u>GCT CCA TCG</u> AAC CTC <u>GCG</u> TCT GGA GTC C (SEC ID Nº. _)
CDR-L3	TAT TAC TGT CAA CAG <u>TGG</u> AGC TTC AAT CCG <u>CCC</u> ACA TTT GGA CAG (SEC ID Nº. _)

Basándose en una comparación de secuencias de los restos de marco conservado de 2H7 murino con el marco conservado consenso V<sub>H</sub>I, V<sub>H</sub>III humano (Figuras 12 y 13) y anticuerpos previamente humanizados (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 (1992)), se introdujeron varias mutaciones de marco conservado en la construcción de Fab 2H7.v2 por mutagénesis dirigida. Estas mutaciones dan como resultado un cambio de ciertos restos de marco conservado consenso humano a los hallados en el marco conservado 2H7 murino, en sitios que podrían afectar a las conformaciones de CDR o contactos de antígeno. La versión 3 contenía V<sub>H</sub>(R71V, N73K), la versión 4 contenía V<sub>H</sub>(R71V), la versión 5 contenía V<sub>H</sub>(R71V, N73K) y V<sub>L</sub>(L46P), y la versión 6 contenía V<sub>H</sub>(R71V, N73K) y V<sub>L</sub>(L46P, L47W).

Se expresaron versiones de Fab humanizadas y quiméricas del anticuerpo m2H7 en *E. coli* y se purificaron de la siguiente manera. Se transformaron plásmidos en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, San Diego, CA) para preparación de ADN bi- y monocatenario. Para cada variante, se secuenciaron completamente las cadenas tanto ligera como pesada usando el método de didesoxinucleótido (Sequenase, U.S. Biochemical Corp.). Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* 16C9, un derivado de MM294, se sembraron en placas LB que contenía carbenicilina 5 µg/ml y se seleccionó una única colonia para expresión proteica. La única colonia se cultivó en 5 ml de LB-carbenicilina 100 µg/ml durante 5-8 h a 37 °C. Se añadió el cultivo de 5 ml a 500 ml de AP5-carbenicilina 100 µg/ml y se permitió que creciera durante 16 h en un matraz de agitación con deflectores de 4 l a 37 °C. El medio AP5 consiste en: 1,5 g de glucosa, 11,0 de Hycasa SF, 0,6 g de extracto de levadura (certificado), 0,19 g de MgSO<sub>4</sub> anhídrido, 1,07 g de NH<sub>4</sub>Cl, 3,73 g de KC1, 1,2 g de NaCl, 120 ml de trietanolamina 1 M, pH 7,4, a 1 l de agua y después se esterilizó por filtración a través de un filtro Sealkeen de 0,1 µm.

Las células se recogieron por centrifugación en un frasco de centrifuga de 1 l (Nalgene) a 3000 x g y se retiró el sobrenadante. Después de congelar durante 1 h, el sedimento se resuspendió en 25 ml de MES 10 mM-EDTA 10 mM frío, pH 5,0 (tampón A). Se añadieron 250 µl de PMSF 0,1 M (Sigma) para inhibir la proteólisis y se añadieron 3,5 ml de lisozima de yema de huevo de gallina 10 mg/ml de reserva (Sigma) para ayudar a la lisis de la pared celular bacteriana. Después de agitar suavemente en hielo durante 1 h, la muestra se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se llevó a 50 ml con tampón A y se cargó en una columna de DEAE de 2 ml equilibrada con tampón A. El flujo continuo se aplicó después a una columna de proteína G-Sepharose CL-4B (Pharmacia) (0,5 ml de volumen de lecho) equilibrada con tampón A. La columna se lavó con 10 ml de tampón A y se eluyó con 3 ml de glicina 0,3 M, pH 3,0, en 1,25 ml de Tris 1 M, pH 8,0. Después se cambió el tampón de F(ab) a PBS usando un Centricon-30 (Amicon) y se concentró hasta un volumen final de 0,5 ml. Se procesaron geles de SDS-PAGE de todos los F(ab) para asegurar la pureza y el peso molecular de cada variante se verificó por espectrometría de masas de electropulverización.

Se construyeron plásmidos para expresión de IgG de longitud completa subclonando los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de Fab quimérico así como Fab humanizado de anticuerpos hu2H7 en vectores pRK previamente descritos para expresión en células de mamífero (Gorman *et al.*, DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10 (1990)). Brevemente, cada construcción de Fab se digirió con *EcoRV* y *BlnI* para escindir un fragmento V<sub>L</sub>, que se clonó en los sitios *EcoRV/BlnI* del plásmido pDR1 para expresión de la cadena ligera completa (dominios V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>). Adicionalmente, cada construcción Fab se digirió con *PvuII* y *Apal* para escindir un fragmento V<sub>H</sub>, que se clonó en los sitios *PvuII/Apal* del plásmido pDR2 para expresión de la cadena pesada completa (dominios V<sub>H</sub>-CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Para cada variante de IgG, se realizaron transfecciones transitorias cotransfectando un plásmido de expresión de cadena ligera y un plásmido de expresión de cadena pesada en una línea celular de riñón embrionaria humana transformada con adenovirus, 293 (Graham *et al.*, J. Gen. Virol., 36: 59-74, (1977)). Brevemente, las células 293 se dividieron el día antes de la transfección, y se sembraron en placas en medio que contenía suero. Al día siguiente, se añadió ADN bicatenario preparado como precipitado de fosfato cálcico, seguido de ADN pAdVantage™ (Promega, Madison, WI), y las células se incubaron durante una noche a 37 °C. Las células se cultivaron en medio sin suero y se recogieron después de 4 días. Los anticuerpos se purificaron de sobrenadantes de cultivo usando proteína A-Sepharose CL-4B, después se intercambió el tampón a succinato sódico 10 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, y se concentró usando un Centricon-10 (Amicon). Las concentraciones de proteína se determinaron por análisis de aminoácidos cuantitativo.

**Ejemplo 3**

Este ejemplo describe la generación de ratones transgénicos (Tg) para BAC CD20 humano y experimentos para estudiar los efectos del anticuerpo anti-CD20 o antagonista de BLYS solo en los ratones hCD20+.

5 Los ratones transgénicos para CD20 humano se generaron a partir de ADN de BAC CD20 humano (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ratones se exploraron basándose en el análisis de FACS de la expresión de CD20 humano. Como puede verse a partir de las representaciones de FACS en la Figura 14, los ratones hemocigotos (Tg<sup>+/-</sup>) y homocigotos (Tg<sup>+/+</sup>) para el transgén expresan CD20 en sus células B B220<sup>+</sup>. La Figura 15 muestra la expresión de diversos marcadores de superficie celular (CD43, IgM, IgD) durante la diferenciación y maduración de células B. En los ratones Tg<sup>+</sup>, hCD20 se expresa en células B inmaduras y pre-B y principalmente en células B maduras. Los ratones Tg<sup>+</sup> se exploraron con respecto a expresión de CD20 humano en las células B de la médula ósea, bazo, LN mesentérico y placas de Peyer; los resultados se muestran en las Figuras 16-19. La selección de las células en B220 y CD43 permite la delimitación en las diversas poblaciones de células B. Los ratones Tg<sup>+</sup> se trataron después con mAb anti-CD20 (1 mg total = 50 mg/kg, equivalente a 3,5 mg para un hombre de 70 kg) para ver los efectos en las células B como se perfila en el esquema en la Figura 20. Se realizaron análisis de FACS en sangre periférica, bazo, ganglio linfático, médula ósea y placas de Peyer. Se controlaron los niveles de suero de mAb anti-CD20. En ratones, el agotamiento de células B se produce en un periodo de 3-4 días de tratamiento con anticuerpo anti-CD20. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, la muerte de células B parece estar mediada por ADCC o apoptosis o ambas. El tratamiento de ratones Tg<sup>+</sup> con mAb anti-CD20 (m2H7) solamente da como resultado el agotamiento de células B en sangre periférica, células B de ganglio linfático periférico maduras, células B T2 y foliculares en el bazo (véase Figuras 21-24). Sin embargo, se observó que ciertos subconjuntos de células B son resistentes a la destrucción por anticuerpo anti-CD20 a pesar de niveles muy altos, probablemente de saturación del anticuerpo en la superficie celular. Estas células B resistentes son las células B de zona marginal en el bazo (Fig. 23), y las células B del centro germinal tanto en las placas de Peyer (Fig. 25) como en el bazo (Fig. 27). En un experimento (Fig. 27), se inyectó a ratones una primera dosis de mAb anti-CD20 a 100 µg el día 1, seguido de una segunda dosis de 100 µg el día 3 (es probable que una única dosis a 50 µg sea suficiente para saturar las células B); se agotaron las células B foliculares/T2 pero se mostró que las células B del centro germinal de las placas de Peyer estaban unidas con mAb anti-CD20 pero eran resistentes a su destrucción.

30 Se siguió la recuperación de células B después del tratamiento con anticuerpos anti-CD20. Se administró a los ratones anticuerpo el día 1. La Figura 26 muestra que el día 6 después del tratamiento con anticuerpos, las células B en la sangre periférica no eran detectables. A la semana 6, después de la eliminación del anticuerpo, las células hCD20<sup>+</sup> comenzaron a detectarse y a la semana 14, las células B parecían haberse recuperado hasta niveles normales. La recuperación surge de células B precursoras que no expresan CD20 que se desarrollan a células B CD20<sup>+</sup> maduras.

35 La Figura 27 muestra representaciones de FACS que demuestran la resistencia de células B de centro germinal esplénico a tratamiento con mAb anti-CD20 a corto plazo (inyección individual). Los ratones se desinmunizaron o inmunizaron con glóbulos rojos de oveja (SRBC) por inyección intraperitoneal el día 1 para inducir centros germinales en el bazo. Los centros germinales aparecen el día 7. El día 8, se trató un grupo de ratones con el mAb m2H7 para CD20 humano. El conjunto de ratones de control se trató con anticuerpo de control de isotipo mIgG2a. Las células del bazo de los ratones se analizaron el día 12. PNA (aglutinina de cacahuete) tiñe el centro germinal. No se vieron células del centro germinal detectables en los bazos de ratones no inmunizados con SRBC mientras que los bazos de ratones inmunizados muestran células con tinción de PNA 0,3 %. Aunque las células B foliculares/T2 se agotan con tratamiento de anticuerpos anti-CD20, las células B del centro germinal en el bazo son resistentes al anticuerpo.

40 A continuación, se determinó si tras el agotamiento de células B, los ratones eran capaces de desarrollar respuesta inmunitaria independiente de T. Los ratones se trataron con m2H7 o anticuerpo de control de isotipo mIgG2a el día 0. Los días 3-7, se produjo agotamiento de células B. Al día 7, se inyectó a los ratones i.v. *Streptococcus pneumonia* IV para inducir una respuesta al polisacárido. Se montó una respuesta independiente de células T el día 11. Los resultados mostrados en la Figura 28 demostraron que el tratamiento con anti-CD20 (2H7 o Rituxan) no afectaba a la respuesta de células B de la zona marginal y centros germinales del bazo, es decir, las células B MZ y B1 no agotadas confieren protección a antígenos independientes de T. Estos datos demuestran que algunos aspectos de las respuestas de células B independientes de T específicamente de inmunidad humoral (en este caso) se conservan a pesar del tratamiento con mAb anti-CD20.

**Ejemplo 4**

60 Este ejemplo demuestra la sinergia entre tratamientos con mAb anti-CD20 y antagonista de BLYS para la modulación/el agotamiento de células B.

65 BAFF/BLYS/TALL-1 (miembro de la superfamilia de TNF) desempeña un papel importante en la supervivencia y maduración de células B inmaduras T2, FO y MZ y potencia la supervivencia competitiva de células B autorreactivas (S. Mandala *et al.*, Science 296, 346-9 (2002); F. Mackay, P. Schneider, P. Rennert, J. Browning, Annu Rev Immunol

21, 231-64 (2003); P. A. Moore *et al.*, Science 285, 260-3 (1999)). La sobreexpresión de una forma soluble de BAFF/BlyS/TALL-1 en ratones da como resultado hiperplasia de células B, hipergammaglobulinemia y síndrome de tipo lupus autoinmunitario (S. A. Marsters *et al.*, Curr Biol 10, 785-8 (2000)). Por el contrario, el tratamiento de ratones propensos a lupus con una proteína de fusión de BAFFR/BR3-Fc, que neutraliza BAFF/BlyS, da como resultado serologías autoinmunitarias, patología renal y mortalidad mejoradas (R. Lesley *et al.*, Immunity 20, 441-53 (2004)).

*Materiales y métodos:*

En los Ejemplos Experimentales, el BR3-Fc o BAFFR/BR3-Fc usado es hBR3-Fc de SEC ID N° 2. Para el experimento mostrado en la Fig. 29, los ratones FVB que expresaban un cromosoma artificial bacteriano que codificaba CD20 humano (designados ratones hCD20<sup>+</sup>) se trataron con inyecciones intraperitoneales de mAb anti-CD20 (inyección individual de 100 microgramos el Día 9), BR3-Fc (100 microgramos cada dos días del Día 1 al 12), o la combinación de mAb anti-CD20 y BR3-Fc. Cada grupo consistió en 4 ratones. Dos días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se analizaron con respecto a células B hCD20<sup>+</sup>. Se analizaron análisis de FACS de bazo, sangre, ganglio linfático y placas de Peyer con respecto a marcadores de células B (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>).

Para el experimento mostrado en la Fig. 30, se trataron ratones Tg<sup>+</sup> hCD20 con IgG<sub>2a</sub> de control, BAFFR/BR3-Fc (100 µg/ratón IP diariamente durante 12 días), mAb anti-hCD20 (100 µg/ratón IP el día 9) o la combinación de BAFFRBR3-Fc y mAb anti-hCD20 (misma dosificación que los grupos de tratamiento individuales). Se aislaron esplenocitos B220<sup>+</sup> el día 13 y se tiñeron con respecto a CD21 y CD23. N = 5 ratones/grupo. La Figura 30 muestra los efectos sinérgicos en el agotamiento de células B de la combinación de mAb anti-CD20 y BR3-Fc en los ratones Tg<sup>+</sup> CD20 humanos. La Figura 31 muestra la cuantificación del agotamiento de células B de bazo totales B220<sup>+</sup>, células B de zona margina (MZ) y foliculares (FO) de ratones Tg<sup>+</sup> hCD20. Los ratones se trataron con dosis individuales de 0,1 mg de IgG<sub>2a</sub> de control, BAFF/BR3-Fc o mAb anti-hCD20. Los esplenocitos se analizaron el día 4. N = 5 ratones/grupo.

*Resultados:*

Estos resultados se muestran en la Fig. 29, Fig. 30 y Fig. 31.

1. La terapia con mAb anti-CD20 agota >99 % de las células B en circulación maduras en la sangre y los ganglios linfáticos.
2. BR3-Fc reduce las células B en circulación maduras en la sangre y los ganglios linfáticos.
3. La terapia con mAb anti-CD20 agota las células B T2 y foliculares, pero no las células B de zona marginal en el bazo.
4. BR3-Fc reduce las células B T2/foliculares y de zona marginal en el bazo.
5. La combinación de mAb anti-CD20 y BR3-Fc actúa de forma sinérgica para agotar todas las poblaciones de células B en el bazo.

El tratamiento de ratones hCD20<sup>+</sup> con BAFFR/BR3-Fc durante ~2 semanas dio como resultado una reducción notable en las células B MZ y T2/FO (Fig. 30, panel 3). El tratamiento combinado de BAFFR/BR3-Fc y mAb anti-hCD20, sorprendentemente, dio como resultado el agotamiento de todos los subconjuntos de células B esplénicos (Fig. 30, panel 4). Para explorar adicionalmente la sinergia potencial de la neutralización de BAFF y mAb anti-hCD20, se cuantificó el alcance de la pérdida de células B cuatro días después del tratamiento con dosis individuales de mAb anti-hCD20 y BAFFR/BR3-Fc. Aunque el tratamiento con dosis individuales de mAb anti-hCD20 o BAFFR/BR3-Fc dio como resultado una pérdida de ~40-50 % de células B MZ y una pérdida de ~33-70 % de células B FO, la combinación de mAb anti-hCD20 y BAFFR/BR3-Fc dio como resultado una pérdida de >90 % de células B MZ y FO (Fig. 31). Por lo tanto, los factores de supervivencia también desempeñan un papel importante en la determinación de la susceptibilidad a agotamiento de células B mediada por mAb anti-hCD20.

**Ejemplo 5**

**Producción de antagonistas de BlyS**

*Producción de BlyS<sub>82-285</sub>*

Se clonó un fragmento de ADN que codificaba BAFF humano (restos 82-285) en el vector de expresión pET15b (Novagen), creando una fusión con un marcador His N-terminal seguido de un sitio de escisión de trombina. Se dejaron crecer cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) hasta fase semilogarítmica a 37 °C en medio LB con carbenicilina 50 mg/l y después se enfriaron a 16 °C antes de la inducción con IPTG 1,0 mM. Las células se recogieron por centrifugación después de 12 h de crecimiento adicional y se almacenaron a -80 °C. El sedimento celular se resuspendió en Tris 50 mM, pH 8,0, y NaCl 500 mM y se sonicó en hielo. Después de centrifugación, el sobrenadante se cargó en una columna de agarosa de Ni-NTA (Qiagen). La columna se lavó con Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM y después se eluyó con un gradiente por etapas en el mismo tampón con imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían BAFF se agruparon, se añadió trombina, y la muestra se dializó

durante una noche frente a Tris 20 mM, pH 8,0 y CaCl<sub>2</sub> 5 mM a 4 °C. La proteína se purificó adicionalmente en una columna monoQ (Pharmacia) y finalmente en una columna de exclusión por tamaño S-200 en Tris 20 mM, NaCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La proteína de BLYS resultante se usó como se describe posteriormente.

##### 5 *Producción de dominio extracelular BR3*

El dominio extracelular de BR3 humano (restos 1 a 61) se subclonó en el vector de expresión pET32a (Novagen), creando una fusión con un marcador de tiorredoxina N-terminal (TRX)-His seguido de un sitio de enteroquinasa proteasa. Se dejaron crecer células *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) a 30 °C y se indujo expresión proteica con IPTG. Se purificó TRX-BR3 sobre una columna de Ni-NTA (Qiagen), se eluyó con un gradiente de imidazol, y se escindió con enteroquinasa (Novagen). Después se purificó BR3 sobre una columna de S-Sepharose, se replegó durante una noche en PBS, pH 7,8, en presencia de glutatión oxidado 3 mM y reducido 1 mM, se dializó frente a PBS, se volvió a purificar sobre una columna de MonoS, se concentró y se dializó en PBS.

##### 15 *Síntesis peptídica*

Se sintetizó miniBR3 como una amida C terminal en un sintetizador peptídico Pioneer (PE Biosystems) usando química de Fmoc convencional. Los tioles de cadena lateral de las cisteínas 19 y 32 se protegieron como derivados de acetamidometilo (Acm) estables frente a ácido trifluoroacético (TFA). Los péptidos se escindieron de la resina por tratamiento con triisopropil silano 5 % en TFA durante 1,5-4 h a temperatura ambiente. Después de la retirada de TFA por evaporación rotatoria, los péptidos se precipitaron mediante la adición de etil éter, después se purificaron por HPLC de fase inversa (acetonitrilo/H<sub>2</sub>O/TFA 0,1 %). La identidad de los péptidos se confirmó por espectrometría de masas por electropulverización. Después de la liofilización, el péptido oxidado se purificó por HPLC. Las fracciones de HPLC que contenían miniBR3 reducido se ajustaron a un pH de ~ 9 con NH<sub>4</sub>OH; el disulfuro entre las cisteínas 24 y 35 se formó después por adición de un exceso pequeño de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, y el péptido oxidado se purificó por HPLC. Los grupos de Acm se retiraron (con formación conjunta del segundo disulfuro) por tratamiento del eluato de HPLC con un pequeño exceso de I<sub>2</sub> durante ~ 4 h. El progreso de la oxidación se controló por HPLC analítica, y el producto final se purificó de nuevo por HPLC. MiniBR3 se biotiniló en el extremo amino terminal en la resina mediante reacción con un exceso molar 10 veces de sulfo-NHS-biotina (Pierce Chemical, Co.). El miniBR3 biotinilado se escindió después de la resina y se purificó como se ha descrito anteriormente para el miniBR3 no biotinilado.

Los siguientes péptidos ECFDLLVRHWVACGLLR (BLYS0027) (SEC ID N°: 9), ECFDLLVRHWVPCGLLR (BLYS0048) (SEC ID N°: 6) y ECFDLLVRAWVPCSVLK (BLYS0051) (SEC ID N°: 5) se sintetizaron en general de la siguiente manera. Los péptidos se sintetizaron en un sistema sintetizador peptídico Rainin Symphony usando resina de amida Rink y un exceso triple de aminoácido protegido por 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) activado con 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) en presencia de un exceso quintuple de diisopropiletilamina (DIPEA). Los aminoácidos se acoplaron dos veces en cada posición antes de desproteger con una solución al 20 % de piperidina en dimetilformamida (DMF) y pasaba al siguiente resto. Se realizaron lavados entre etapas de acoplamiento usando dimetilacetamida (DMA). Después del acoplamiento del aminoácido final en el péptido y su desprotección con piperidina al 20 % en DMF, los péptidos se aclararon en su extremo amino terminal usando 3 equivalentes de anhídrido acético y 5 equivalentes de DIPEA en DMA. Como alternativa, el extremo amino terminal se modificó mediante acilación con 5-carboxifluoresceína, con (+)-biotina, o mediante la reacción con otro fluoróforo o molécula indicadora. El péptido se escindió después de la resina mediante tratamiento con una solución de ácido trifluoroacético al 95 % (TFA) que contenía agua 2,5 % y triisopropilsilano 2,5 % durante 90 minutos. Los volátiles se retiraron bajo presión reducida, se añadió dietil éter y se retiraron por filtrado los sólidos. El precipitado resultante se lavó de nuevo con dietil éter y se descartaron los productos orgánicos combinados. Los sólidos lavados se lavaron después sucesivamente con ácido acético, una mezcla 1:1 de ácido acético y acetonitrilo, una mezcla 1:1:1 de ácido acético, acetonitrilo y agua, una mezcla 1:1:8 de ácido acético, acetonitrilo y agua y finalmente con agua. Los lavados combinados se liofilizaron y los péptidos en bruto resultantes se purificaron usando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa C18 usando un gradiente del 10 % al 70 % de 30 minutos de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,1 % en cada disolvente a un caudal de 15 mililitros por minuto. Las fracciones que contenían el péptido deseado se oxidaron mediante la adición de una solución saturada de yodo en ácido acético hasta que la solución permaneció coloreada. Esta solución se liofilizó después. Finalmente, el péptido oxidado en bruto liofilizado se purificó una segunda vez en condiciones idénticas y las fracciones que contenían el péptido deseado se liofilizaron. Algunos de los péptidos se sintetizaron en condiciones idénticas excepto que la síntesis se realizó en un sintetizador automático PerSeptive Pioneer usando un exceso cuádruple de aminoácidos, acoplando solamente una vez por cada resto.

##### 60 **Ejemplo 6**

###### **Presentación en fagos de cadenas de 17 unidades**

*Construcción de bibliotecas.* Se usó un fagémido que codifica la secuencia de señal de secreción de STII ("ss STII"), un enlazador (GGGSGGG, SEC ID N°:\_) y una secuencia que codifica los restos C terminales de la proteína menor III del fago M13 (por ejemplo, restos 267-421) (en lo sucesivo en el presente documento, "cP3") como un molde para

65

la construcción de bibliotecas. Se construyeron dos bibliotecas usando técnicas de mutagénesis de Kunkel y oligonucleótidos que introdujeron un fragmento correspondiente a los restos 23-39 de BR3 humano con una mutación C32W también conocida como "C32W de 17 unidades", y adicionalmente mutaciones codificadas dentro de la región C32W de 17 unidades. Específicamente, la biblioteca 1 codificaba codones de reemplazo en los restos numerados 31, 34 y 36-39 (codón de reemplazo: NNS = cualquier codón), y la biblioteca 2 codificaba los restos de codones de reemplazo 27, 30, 31, 34 y 36-39 (codón de reemplazo: VNC = codifica los aminoácidos L, P, H, R, I, T, N, S, V, A, D y G). En los codones de reemplazo: N es 25 % A, 25 % C, 25 % G, 25 % T; S es 50 % G/50 % C; V es 33 % G/33 % A/33 % C; y C es 100 % C. La Biblioteca 1 codificaba  $1,1 \times 10^9$  miembros y la Biblioteca 2 codificaba  $4,3 \times 10$  miembros.

*Clasificación de bibliotecas.* El fago se sometió a cuatro ciclos de selección. En general, la aportación de fagos por cada ciclo fue de  $10^{14}$  fagos para el 1º ciclo (clasificación de fase sólida) y  $3 \times 10^{12}$  fagos para ciclos adicionales (clasificación de fase en solución).

*Elección de fagos.* El primer ciclo de selección fue un método de clasificación de fase sólida. Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp (96 pocillos) con BLYS<sub>82-285</sub> preparado como se ha descrito anteriormente (100 µl a 2 µg/ml en tampón de carbonato 50 mM (pH 9,6)) durante una noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon después durante una hora con BSA 0,2 % (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lavaron 3-5 veces con PBS, Tween20 0,05 %. Se añadieron a los pocillos partículas de fagos (100 µl/pocillo en tampón de ELISA (PBS/BSA 0,5 %/Tween20 0,05%)). Después de dos horas, los pocillos se lavaron varias veces con PBS, Tween20 0,05 %. Los fagos unidos a los pocillos se eluyeron con HCl 0,1 N durante 10 min a TA. Los fagos eluidos se neutralizaron añadiendo 1/20 del volumen de Tris 2 M pH 11,0.

Para titular los fagos, se infectaron XL-1 en fase logarítmica (DO 600 nm ~0,3) con fago eluido a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, las células infectadas se diluyeron en serie en incrementos de 10 veces en 2YT. Se sembraron en placas alícuotas de 10 µl de las células infectadas por cada placa de carbenicilina. Se obtuvieron  $\sim 10^8$  fagos de cada biblioteca del primer ciclo de selección.

Para propagar los fagos, se usaron fagos eluidos para infectar XL-1 en fase logarítmica (DO 600 nm ~ 0,3) a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron fagos auxiliares, KO7, y carbenicilina a la infección a una concentración final de  $1 \times 10^{10}$  ufp/ml de KO7 y carbenicilina 50 µg/ml a 37 °C durante otros 30 minutos. El cultivo se dejó crecer en medio 2YT con carbenicilina 50 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml hasta volúmenes finales de 25 ml a 37 °C durante una noche.

Los fagos se purificaron sedimentando por centrifugación las células a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió. Se añadió PEG 20 %/NaCl 2,5 M a 1/5 del volumen de sobrenadante, se mezcló y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los fagos se sedimentaron por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento de fagos se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 5000 rpm. Los sedimentos se resuspendieron en 0,7 ml de PBS y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos para eliminar los residuos. La DO del sedimento de fagos resuspendidos se leyó a 268 nm.

Los ciclos de selección de segundo a cuarto utilizando métodos de clasificación en solución. Para el segundo ciclo, se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp Nunc con neutravidina 5 µg/ml (Pierce) a 4 °C durante una noche. A continuación, la placa se bloqueó con Superblock 200 µl/ml (Pierce) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió Tween20 a cada pocillo para una concentración final de 0,2 % (v/p) y se bloqueó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Los fagos amplificados, purificados del primer ciclo de selección se incubaron con BLYS biotinilado 50 nM (concentración final) en 150 µl de tampón que contenía Superblock 0,5 % y Tween20 0,1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las mezclas se diluyeron después 5-10X con PBS/Tween 0,05 % y se aplicaron a 100 µl/pocillo a la placa de recubrimiento de neutravidina. La placa se agitó suavemente durante cinco minutos a temperatura ambiente para permitir que los fagos unidos a BLYS biotinilados se capturaran en los pocillos. Los pocillos se lavaron después con PBS/Tween 0,05 % varias veces. Se eluyeron fagos unidos con HCl 0,1 N durante 10 min, se neutralizaron, se titularon, se propagaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron  $\sim 3 \times 10^6$  fagos de cada biblioteca del segundo ciclo de selección.

El tercer ciclo de selección fue similar al segundo ciclo, excepto que se incubó una concentración de BLYS biotinilado 2 nM con el fago antes de la dilución y adición a cada pocillo. Los fagos unidos se eluyeron con HCl 0,1 N durante 10 min, se neutralizaron, se titularon y se propagaron como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron  $\sim 10^4$  fagos de cada biblioteca del tercer ciclo de selección.

A continuación se sometieron los fagos del tercer ciclo de selección a dos métodos de selección diferentes en el cuarto ciclo. El método 4a fue similar a los segundo y tercer ciclos de selección excepto que el fago se incubó en presencia de BLYS biotinilado 0,5 nM durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla se incubó después durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente en presencia de un exceso de 1000 veces (500 nM) de BLYS no biotinilado antes de la dilución y adición a los pocillos recubiertos. El método 4b también fue similar a los segundo y tercer ciclos de selección excepto que se incubó BLYS 0,2 nM con el fago antes de la dilución y adición a cada pocillo. Los fagos unidos de cada selección de ciclo cuatro se eluyeron con HCl 0,1 N durante 10 min, se

neutralizaron, se titularon y se propagaron como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron  $\sim 10^3$  fagos para cada biblioteca de cada uno de los cuartos ciclos (4a y 4b) de selección.

*Análisis de clones.* Después del cuarto ciclo de selección, se cultivaron clones individuales en un formato de 96 pocillos en 400  $\mu$ l de medio 2YT complementado con carbenicilina y fago auxiliar KO7. Los sobrenadantes de estos cultivos se usaron en ELISA de fagos. Para ELISA de fagos, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante una noche a 4 °C con 100  $\mu$ l de una solución 2  $\mu$ g/ml de BLYS en tampón de carbonato, pH 9,6. La placa se lavó con PBS y se bloqueó con BSA 0,5 % en PBS durante dos horas. El sobrenadante de fagos se diluyó 1:4 en tampón de unión de ELISA (PBS, BSA 0,5 %, Tween20 0,05 %) en ausencia o presencia de BLYS 50 nM y se incubó durante 1 h a TA. Se transfirieron después 100  $\mu$ l de los sobrenadantes de fago diluidos a las placas recubiertas y se permitió que se agitaran suavemente para capturar fagos durante 20 minutos. Las placas se lavaron después con PBS/Tween20 al 0,05 % varias veces. Después se transfirieron 100  $\mu$ l por pocillo de anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP en PBS/Tween20 al 0,05 % (1:5000) a las placas y se incubaron durante 20 min. Después de lavar con PBS/Tween 0,05 % seguido de PBS, la placa se incubó 5 min con 100  $\mu$ l de solución de sustrato de PBS / que contenía OPD 0,8 mg/ml (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 %. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ l/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y la placa se leyó a 490 nm. Los clones ensayados se secuenciaron después como se ha descrito previamente (Weiss, G. A., Watanabe, C. K., Zhong, A., Goddard, A., y Sidhu, S. S. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8950-8954). Se tradujeron y alinearon secuencias de calidad aceptable. Las secuencias de aminoácidos de 17 unidades se muestran en la FIG. 32.

Se analizaron adicionalmente catorce clones en un ensayo de unión de BLYS para determinar su valor de CI50. Los clones 2 y 7 tuvieron un mayor número de hermanos (clones con una secuencia idéntica) en el cuarto ciclo. De acuerdo con el ensayo de ELISA de fagos, se inhibió en gran medida la unión de los clones 13, 19, 22, 26, 32, 39 y 44 con la placa por BLYS 50 nM (FIG. 11). La unión de los clones 35, 45, 68, 82 y 90 también se inhibió en gran medida en el ensayo de ELISA de fagos (FIG. 11). Se usaron sobrenadantes de fagos de estos 14 clones para infectar XL-1 de fase logarítmica que se propagaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente.

Para normalizar con respecto a presentación y rendimiento de fagos y determinar la dilución apropiada de fagos para medición de CI50, se incubaron diluciones en serie de fagos purificados de cada clon en tampón de unión de ELISA (PBS, BSA al 0,5 %, Tween20 0,05 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Se transfirieron 100  $\mu$ l de cada dilución a placas recubiertas con BLYS y se permitió que se agitaran suavemente para capturar fagos durante 20 minutos como se ha descrito anteriormente. Los fagos unidos se detectaron por anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP, seguido de reacción de sustrato OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se inactivó y se leyó a 490 nm como se ha descrito anteriormente. Por este proceso, se determinó la dilución de cada clon que producía -1 D.O. a 490 nm y se usó en el ensayo de CI50.

Para determinar el valor de CI50 de cada uno de los 14 clones, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante una noche a 4 °C con 100  $\mu$ l de una solución 2  $\mu$ g/ml de BLYS en tampón de carbonato, pH 9,6, y se lavó y bloqueó como se ha descrito anteriormente. Se incubó una dilución de fagos amplificados, purificados para cada uno de los 14 clones en presencia de una serie de concentraciones de BLYS que variaban de 0,003-1000 nM en 130  $\mu$ l de tampón de unión de ELISA (PBS, BSA 0,5 %, Tween20 0,05 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Se transfirieron 100  $\mu$ l de cada una de estas series de concentraciones a placas recubiertas con BLYS y se capturaron, se lavaron, se detectaron con anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Los valores de CI50 se determinaron por un ajuste de cuatro parámetros de la señal ELISA para cada uno de los 14 clones. Los valores de CI50 variaron de 0,4 (clon 44) a 11 nM (clon 22).

*ELISA de desplazamiento competitivo.* Se sintetizaron las siguientes cadenas de 17 unidades, Ac-ECFDLLVRHWVACGLLR-NH<sub>2</sub> (SEC ID N°:\_) ("BLYS0027"), Ac-ECFDLLVRHWVPCGLLR-NH<sub>2</sub> (SEC ID N°:\_) ("BLYS0048"), Ac-ECFDLLVRAWVPCSVLK-NH, (SEC ID N°:\_) ("BLYS0051") como se ha descrito anteriormente. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante una noche a 4 °C con 100  $\mu$ l de una solución 2  $\mu$ g/ml de BLYS en tampón de carbonato, pH 9,6. La placa se lavó con PBS y se bloqueó con leche desnatada 1 % en PBS. Se prepararon diluciones en serie del ECD de BR3 (restos 1-61) y los péptidos de 17 unidades anteriores en PBS/Tween20 0,05 % que contenían miniBR3 biotinilado 3 ng/ml. Después de lavar con PBS/Tween 0,05 %, se transfirieron 100  $\mu$ l/pocillo de cada dilución y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS/Tween 0,05 % y se incubó 15 min con 100  $\mu$ l/pocillo de Estreptavidina-PDO 0,1 U/ml (Boehringer Mannheim) en PBS/Tween 0,05 %. Después de lavar con PBS/Tween 0,05 % seguido de PBS, la placa se incubó 5 min con 100  $\mu$ l de solución de sustrato PBS que contenía OPD 0,8 mg/ml (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 %. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ l/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y la placa se leyó a 490 nm. Se determinaron los valores CI<sub>50</sub> por un ajuste de cuatro parámetros de la señal de ELISA de desplazamiento competitivo. Las concentraciones de soluciones madre iniciales de miniBR3 y dominio extracelular de BR3 se determinaron por análisis de aminoácidos cuantitativo.

Los valores de CI50 se determinaron para ECD de BR3, BLYS0027, BLYS0048 y BLYS0051 usando este ensayo. Todos los péptidos de 17 unidades tuvieron mayor afinidad para BLYS que el ECD de BR3 de 62 unidades.

**Ejemplo 4****Conjugados de péptido-PEG**

5 *Producción de BlyS<sub>82-285</sub> y síntesis peptídica.* Como se ha descrito en el Ejemplo 5 anterior.

10 *Conjugación de polímeros con péptidos.* Se generaron péptidos de 17 unidades PEGilados usando PEG lineales modificados con química de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) para reaccionar con aminas primarias (lisinas y extremo N terminal). Todos los reactivos PEG-NHS (PEG-SPA) se obtuvieron de Nektar Therapeutics, San Carlos, CA y se almacenaron con nitrógeno a -70 °C. El péptido se disolvió a 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). A alícuotas de 0,4 ml de la solución peptídica se añadieron 2KPEG-SPA, 5KPEG-SPA, o 20KPEG-SPA sólidos. Se añadió suficiente sólido para obtener una relación molar 3:1 de PEG-SPA y péptido. Estas soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se analizó el progreso de la reacción por HPLC analítica de fase inversa en una parte de 50 µl de la solución. La adición e incubación de PEG se repitió 2 veces hasta que se hubo modificado todo el péptido. Los péptidos PEGilados se ensayaron con respecto a unión con BlyS sin purificación adicional. La relación de PEG:péptido en el producto conjugado purificado es de aproximadamente 1:1.

20 *ELISA de desplazamiento competitivo.* Se sintetizó una cadena de 17 unidades Ac-ECFDLLVRHWVPCGLLR-NH<sub>2</sub> (SEC ID N<sup>o</sup>:\_) ("blys0048") como se ha descrito anteriormente. Se sintetizó ECFDLLVRHWVPCGLL K (blys0095) (SEC ID N<sup>o</sup>:\_) y se acopló a cada uno de los PEG-NHS de 2K, 5K y 20K como se ha descrito anteriormente. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp durante una noche a 4 °C con 100 µl de una solución 2 µg/ml de BlyS en tampón de carbonato, pH 9,6. La placa se lavó con PBS y se bloqueó con leche desnatada 1 % en PBS. Se prepararon diluciones en serie de mini-BR3 (SEC ID) y el péptido de 17 unidades anterior y conjugado de PEG-péptido en PBS/Tween 20 0,05 % que contenía miniBR3 biotinilado 3 ng/ml. Después de lavar con PBS/Tween 0,05 %, se transfirieron 100 µl/pocillo de cada dilución y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS/Tween 0,05 % y se incubaron 15 min con 100 µl/pocillo de Estreptavidina-PDO 0,1 U/ml (Boehringer Mannheim) en PBS/Tween 0,05 %. Después de lavar con PBS/Tween 0,05 % seguido de PBS, la placa se incubó 5 min con 100 µl de solución de sustrato de PBS que contenía OPD 0,8 mg/ml (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 %. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y la placa se leyó a 490 nm. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron por un ajuste de cuatro parámetros de la señal de ELISA de desplazamiento competitivo. La ecuación es:  $y = m_1 + (m_2 - m_1) / (1 + m_0 / m_4)^{m_3}$ , en la que  $m_1$  es la absorbancia a concentración de competidor infinita,  $m_2$  es la absorbancia sin competidor añadido,  $m_3$  es la pendiente de la curva cerca del punto medio,  $m_4$  es el valor de CI<sub>50</sub> y  $m_0$  es la concentración del competidor, péptido en este caso. La concentración de miniBR3 biotinilado fue de aproximadamente 10 pM. La concentración de solución madre inicial de miniBR3 se determinó por análisis de aminoácidos cuantitativo.

**Resultados**

40 El ajuste de cuatro parámetros de las señales de ELISA de desplazamiento competitivo proporcionó valores de CI<sub>50</sub> para: blys0095 de 19 nM, blys0048 de 14 nM y conjugado blys0095-2kPEG de 43 nM, y conjugado blys0095-5kPEG de 51 nM usando este ensayo. De forma similar, el ajuste de las señales de ELISA de desplazamiento competitivo para un experimento separado proporcionó valores de CI<sub>50</sub> para conjugado de blys0095-20kPEG de 99 nM y blys0048 de 15 nM.

45 Los conjugados de péptido de 17 unidades-PEG (2k, 5k y 20 k) demostraron capacidad de unión para BlyS. La conjugación de PEG con blys0095 no redujo significativamente su afinidad de unión en comparación con péptidos no conjugados similares.

**Conclusión**

50 Los experimentos del presente documento demostraron resultados sorprendentes porque la combinación de mAb anti-CD20 y BR3-Fc dio como resultado gran sinergia en el agotamiento de todos los subconjuntos de células B.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para agotar células B de una población mixta de células *in vitro*, que comprende poner en contacto la población mixta de células con un antagonista de BLYS y un anticuerpo de unión a CD20, en el que el antagonista de BLYS se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-BLYS, en donde el anticuerpo anti-BLYS bloquea parcial o completamente la interacción de BR3 con un polipéptido de BLYS; un anticuerpo anti-BR3; una inmunoadhesina de BR3; o un polipéptido que tiene la secuencia de SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células B para agotamiento son células B de zona marginal o células B de centro germinal.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de BLYS es una inmunoadhesina de BR3.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la inmunoadhesina de BR3 es hBR3-Fc de SEC ID N°: 2.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de BLYS es un anticuerpo anti-BLYS.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de BLYS es un anticuerpo anti-BR3.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de unión a CD20 es rituximab.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de unión a CD20 es un anticuerpo humanizado.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de unión a CD20 es un anticuerpo humanizado que es hu2H7v.16 que tiene la secuencia de cadena ligera y cadena pesada de SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, respectivamente.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 producen un efecto sinérgico para agotar las células B.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de unión a CD20 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD20 humanos, ibritumomab tiuxetan, yodo 1131 tositumomab, tositumomab/yodo 1131 tositumomab, m2H7, hu2H7, Tositumomab, 1 F5, ch2H7, AME-133, A20, A20 quimérico, A20 humanizado, L27, G28-2, 93-1 B3, B-C1 y NU-B2.
12. Un antagonista de BLYS y un anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso en un método para agotar células B de una población mixta de células, en donde el antagonista de BLYS se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-BLYS, en donde el anticuerpo anti-BLYS bloquea parcial o completamente la interacción de BR3 con un polipéptido de BLYS; un anticuerpo anti-BR3; una inmunoadhesina de BR3; o un polipéptido que tiene la secuencia de SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10; y en donde el método comprende administrar el antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación a un mamífero que lo necesite.
13. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las células B para agotamiento son células B de zona marginal o células B de centro germinal.
14. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de unión a CD20 y el antagonista de BLYS son para administración simultánea.
15. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de unión a CD20 y el antagonista de BLYS son para administración secuencial.
16. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antagonista de BLYS es para administración antes del anticuerpo de unión a CD20.
17. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antagonista de BLYS es una inmunoadhesina de BR3.
18. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la inmunoadhesina de BR3 es hBR3-Fc de SEC ID N°: 2.
19. El antagonista de BLYS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la

reivindicación 12, en donde el antagonista de BLyS es un anticuerpo anti-BLyS.

- 5 20. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antagonista de BLyS es un anticuerpo anti-BR3.
21. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de unión a CD20 es un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de un anticuerpo murino fusionado con las regiones constantes de un anticuerpo humano.
- 10 22. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el anticuerpo quimérico es rituximab.
23. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de unión a CD20 es un anticuerpo humanizado.
- 15 24. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de unión a CD20 es un anticuerpo humanizado que es hu2H7v.16 que tiene la secuencia de cadena ligera y cadena pesada de SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16, respectivamente.
- 20 25. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antagonista de BLyS el anticuerpo de unión a CD20 producen un afecto sinérgico para agotar las células B.
- 25 26. El antagonista de BLyS y el anticuerpo de unión a CD20 en combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD20 humanos, ibritumomab tiuxetan, yodo 1131 tositumomab, tositumomab/yodo 1131 tositumomab, m2H7, hu2H7, Tositumomab, 1 F5, ch2H7, AME-133, A20, A20 quimérico, A20 humanizado, L27, G28-2, 93-1 B3, B-C1 y NU-B2.

1 AGCATCCIGA GTRATGAGTG GCCTGGGCGG GAGCAGCCGA GFRGGCCGGA SCCGTGTGGA CCRAGGAGGAG CGCTTTCCAC AGGCCCTETG GACGGGGGTG  
 TCGTAGGACT CATTAICTAC CGGACCCGGC CTGCTCCGCT CCACCGGCTT CCGCACACTT GGTCCCTCCTC GCGAAGGTG TCCGGACAC CTGCCCCAC  
 1 M S G L G R S R R G G R S R V D Q E E R F P Q G L W T G V  
 101 GCTATGAGT CCTGCCCCGA AGACRGTAC TGGATCCTC TGTGGGTAC CTGCATGTCC TGCRAAACCA TTTGCAACCA TCRAGGCAG CGCACTGTG  
 CGATACTTA GGACGGGCT TCTGTCATG ACCCTAGAG ACACCCCTG GACGTACAG ACCTTTTGT AAACGTGTGT AGCTCGGTG EGTGACAC  
 30 A M R S C P E E Q Y W D P L L G T C M S C K T I C N H Q S Q R T C A  
 201 CAGCTTCTG CAGSTCACTC AGCTGCGCA AGGACGAGS CAAGTCTAT GACCATCTCC TGAGGACTG CATCAGCTGT GCCTCCATCT GTGGACAGCA  
 GTCCGAGAC GTCCAGTGAG TCGACGGGCT TCCTCGTTCC GTTCAAGATA CTGGTAGAGS ACTCCCTGAC GTAGTCGACA CCGAGGTAGA CACCTGTCTG  
 64 A F C R S L S C R K E Q G K F Y D H L L R D C I S C A S I C G Q H  
 301 CCCTAAGCAA TGTGCATACT TCTGTGAGAA CAAGCTCAGG AGCCCACTGA ACCTTCCACC AGAGCTCAGG AGRACRGGGA GTGGAGAAT TGAARACAA  
 GGGATCTGTT ACACGTATGA AGACACTTIT GTTCGAGTCC TCGGTACT TGAAGGTGG TCTCGAGTCC TCTGTGCTT CACCTCTTCA ACTTTTCTA  
 97 P K Q C A Y F C E N K L R S P V N L P P E L R R Q R S G E V E N N  
 401 TCRACAACT CGGAAAGTA CCRAGGATTG GACACAGAG GCTCAGAGC AATCCAGCT CTCCCGGGC TGRAGCTAG TCGAGTACG GTGGCCCTGG  
 AGCTGTGTA GCCCTTCCAT GGTTCCTAAC CTGCTGCTC CGASTCTCG TTCAAGTGA GGGGCCCG ACITGACTC AGTCTAGT CACCGGAC  
 130 S D N S G R Y Q G L E H R G S E A S P A L P G L K L S A D Q V A L V  
 501 TCTACAGCAC GCTGGGCTC TCCCTCTG CCGTCTCTG CTGCTCTG GTGGGGTG CCTGCTCTT CAAGAGAGG GGGATCCCT GCTCCTGCCA  
 AGATGCTGTG CGACCCCGAG ACGGACACAC GCGAGGAGAC GACGAGAC CACGCCACC CCGCTCTCC CCGCTAGGGA CGAGGACGGT  
 164 Y S T L G L C L C A V L C C F L V A V A C F L K R G D P C S C Q  
 601 GCCCCGCTCA AGCCCGGTC AAGTCCGGC CAGTCTTCC CAGGATCAG CGATGPRAG CCGCAGCCCT GTGAGCACAT CCCCAGGCC AGTGGAGACC  
 CCGGGGAGT TCCGGGGCAG TTTCAAGCGG GTTCAGAGG GTCTAGTGC GCTACTTCC GCGTGGGA CACTCTGTA GGGGCTCG TCACTCTGG  
 197 P R S R P R Q S P A K S S Q D H A M E A G S P V S T S P E P V E T  
 701 TCRAGTCTT GCTTCCCTGA GTGAGGGGG CCCACGAGG AGRAGCCAGT CACGCTGGG ACCCCGACC CCACCTGTGC TGRAGGTGG GGGTCCACA  
 ACGTCAAGA CGAAGGACT CAGTCCCGC GGTGGGTCC TCTGGGTCA GTGGGACCC TGGGGCTGG GGTGACACG ACCTCCACC CCGACGGTGT  
 230 C S E C F P E C R A P T Q E S A V T P G T P D P T C A G R W G C H T  
 801 CCAGGACCAC AGTCTGCGAG CCTTGCACC ACATCCAGA CAGTGGCTT GGCATTTGT GTGTGCTGC CCRGGAGGG GGCACAGGTG CATARATGGG  
 GGTCTGGT TCRAGAGTCC GGAACGGGTG TGTAGGTCT GTACCGGAA CCGTAAACA CACACGAGG GGTCTCCCG CCGGTCCAC GTATTTCOC  
 264 R T T V L Q P C P H I P D S G L G I V C V P A Q E G G P G A O

FIG.-1A

901 GGTACGGAG GGAAGGAGG AGGAGAGAG ATGGAGAGGA GGGAGAGAG AAAGAGAGGT GGGAGAGGG GAGAGAGATA TGAGAGAGA GAGACAGAGG  
 CCAGTCCCTC CCTTTCCCTC TCCCTCTCTC TACTCTCTCT CCCCCTCTCC TTTCTCTCCA CCCCCTCTCC CTCTCTCTAT ACTCCTCTCT CTCTGTCTCC  
 1001 AGGCAGAAAG GGAGAGAAC AGAGAGACA GAGAGGAGA GAGAGGAGA GAGAGGAGA GAGAGGGA AGAGAGCCA GAGAGGAAA GAGGCAGAGA  
 TCCGTCTTTC CCTCTCTTG TCTCCTCTGT CTCTCCCTCT CTCTCTCTCT CCCCCTCTCT CTCTCTCTCT TTCTCTCCGT CTCTCCCTTT CTCCGTCTCT  
 1101 AGAAGAGAGA CAGGCAGAGA AGGACAGAG CAGAGAGGA GAGAGGAGA GAGAGGAGA GGCAGAGAGA CAGAGAGGA GAGAGGACA GAGAGAGATA  
 TCCCTTCTCT GTCCGTCTCT TCCCTCTCTCC GTCTCTCTCT CTCTCCGTCT CTCTCTCTCT CCGTCTCTCT GTCTCTCCCT CTCTCCTGT CTCTCTCTAT  
 1201 GAGCAGGAGG TCGGGGCACT CTGAGTCCCA GTTCCAGTG CAGCTGTAGG TCGTCTCAC CTAACCCAC CTAACCCAC GTCCATATA GTCCCTGTGC CTGCTGCTCA  
 CTGGTCTTCC AGCCCCGIGA GACTCAGGCT CAAGGTCCAC GTCCACATCC AGCAGTAGTG GATGGGTG CACGTTATT CAGGAGCACG GACGACGAGT  
 1301 CAGCCCCCGA GAGCCCCCTC TCCTGGAGAA TAAACCTTT GGCAGCTGCC CTCTCTCAA AAAAAAAA AAAAAA  
 GTCCGGGGCT CTCGGGGAGG AGGACCTCTT ATTTGGAAA CCGTCCAGCG GAAGGATTT TTTTTTTTT TTTTTT

**FIG. 1B**

1 1 AAGACTCAAA CTTAGAACT TGAATTAGAT GTGGTATCA AATCCTTAGG TGCCGGGAG ACACAGACAG CCCCCTTAG ACCCCAGAA GCAGGGGAG  
TTCTGAGTTT GAATCTTGA ACTTAATCA CACCAATAGT TTAGGATGC ACGGCGCTTC TGTGTCTGC GGGGGCATTC TTGGGTGCTT CBTCCGCTTC  
201 TTCATTGTC TCAACATCT AGCTGCTCTT GCTGCAATG CTTGTAAGA TANTACTTGT CTTCCAGGC TGTTCTTTCT GTAGTCCCT  
AAGTAAAG AGTTGTAGA TCGACGAGAA CGACGTAAAC GAGACCTTA GACATCTCT AFAATGAACA GGAAGTCCG ACARARRAGA CATCGRGGGA  
201 TGTTTTCTT TTGTGATCAT GTTCAGATG GCTGGCCAGT GCTCCAAA TGAATATTT GACAGTTGT TGCATGCTT CATACCTGT CAACCTGGAT  
ACAAAAGAAA AACACTAGTA CAACGTCTAC CGACCCGICA CGAGGTTTT ACTATAAAA CTGTCAACA ACGTAGAAC GTATGGAACA GTTGAAGCTA  
1 Me tLeuGlnMet AlaGlyGlnC ysSerGlnAs nGluFyrPhe AspSerLeuL euHisAlaCy sileProCys GlnLeuArgC  
301 GTTCTTCTAA TACTCTCCTT CTACATGTC AGGTTATTG TAATGCAAGT GTGACCAATT CAGTGAAGG AACGAATGG ATTCTCTGA CCTGTTTGGG  
CAAGAGATT ATGAGGAGG GATTGTACAG TCGCAATAC ATTGCTTCA CACTGGTAA CTCACCTTCC TTGCTTACG TAAGAGACCT GCACARACCC  
29 ysSerSerAs nThrProPro LeuThrCysG lnArgTyrCy sAsnAlaser ValThrAsnS erValLysG l yThrAsnAla IleLeuTyrP hrCysLeuG l  
401 ACTGAGCTTA AFAATTTCTT TGGCAGTTT CGTGCTAATG TTTTGTCTAA GGAATATAG CTCTGAACCA TTAAGGAGC AGTTTAAAA CACAGGATCA  
TGACTCGAAT TATTAAGAA ACCGTCAAA GCAGGATTAC AAAACGATT CCTTCTATT CAGACTTGTG AATTCCTGC TCAAATTTT GTGTCTTAGT  
62 yLeuSerLeu IleIleSerL euAlaValPh eValLeuMet PheLeuLeuA rGlyLysIleS rSerGluPro LeuLysAspG lupheLysAs nThrGlySer  
501 GGTCTCTGG GATGGCTAA CATTGACCTG GAAAGAGCA GACTGGGA TGAATATTT CTTCCGAGG GCTCCAGTA CACGGTGGAA GAATGCACCT  
CCAGAGGACC CGTACCGATT GTAACCTGAC CTTTCTCGT CCTGACCACT ACTTAAATAA GAAGCTCTC CGAGCTCAT GTGCCACCTT CTTACGTGGA  
95 GlyLeuLeuG l yMetAlaAs nIleAspLeu GluLysSerA rGThrGlyAs pGluIleIle LeuProArgG l yLeuGluFy rThrValGlu. GluCysThrC  
601 GTGAGACTG CATCAAGAGC AAACCGAAG TGCACTCTGA CCATTGCTTT CCACCTCCAG CTATGAGGA AGCGCAACC ATTCTTGTCA CCAGAAAC  
CACTTCTGAC GTACTTCTCG TTGGCTTCC AGCTGAGACT. GGTAAACGAA GGTGAGGTC GATACCTCTT TCCCGTTGG TAAAGACAGT. GGTCTTTT  
129 ysGluAspCy sIleLysSer LysProLysV alAspSerAs phisCysPhe ProLeuProA laMetGluG l uGlyAlaThr IleLeuValT hrThrLysTh  
701 GAATGACTAT TGCAAGAGCC TGCCAGCTGC TTTGAGTGT ACGGAGATAG ARAATCAAT TTCTGTAGG TAATTAACCA TTTGACTCG AGCAGTGCCA  
CTTACTGATA ACGTCTCGG ACGTCCAGC AACTCAGCA TGCTCTATC TCTTATGTA AAGACATCC ATTAATTTGT AATGCTGAGC TCCTCAGGCT  
162 rAsnAspFyr CysLysSerL euProAlaAl aLeuSerAla ThrGluLleG l uLysSerI l eSerAlaArg OC\*  
801 CTTTAAAAAT CTTTTGTCAG AATGATGAT GTGICAGATC TCTTAGGAT GACTGIANTT TTCAGTGGC GAPACAGCTT TTTGTCTCTT AACTGTGAA  
GAAATTTTA GAAACAGTC TTATCTACTA CACAGCTTAG ARAATCTTA CTGACATAAA AAGTCAACGG CTATGTGAA AAGCAGGAGA TTGCACACTT  
901 ACICTTTATG TTAGATATAT TTCTCTAGGT TACTGTGGG AGCATAATGG TAGAARCTC CTTGGTTCA TGATTAAGT CTTTTTTTT CCTGA  
TGAGAAATAC AATCTATATA AAGAGATCCA ATGACACACC TCGAATACC ATCTTTGAG GACCAAGT ACIAATTTCA GAAAAAAA GGACT

FIG.-2

1 ATGGAIGACI CCRCRGAARG GGAGCAGTCA GGCCTTACTT CTTCCTTAA GAARAGAGA. GAATGAAAC TGAAGGAGTG TGTTCATC CTCCRCGGG  
 TACTTACIGA GGTGTCTTTC CCTCGTCRGT GCGGAATGAA GAACGGRAIT CTTTCTCTT ACTTCTCTAC ACAAGGTAG GAGGGTGCCT  
 1 M D S T E R E Q S R L T S C L K K R E E M K L K E C V S I L P R K  
 101 AGRAAGCC CTCTGTCCGA TCTCCAAAG ACGAAAGCT GCTGGCTCA ACCTGTCTG TGGCACTGT GTCTTGTCTG CTCACGGTGG TGTCTTCTTA  
 TCCTTTCCGG GAGACAGGCT AGGAGTTTC TSCCTTCCGA CGACCGACGT TGGACGAGC ACCGTGACGA CAGACGAGC GAGTGCCACC ACAGARAGAT  
 35 E S F S V R S S K D G K L L A A T L L L A L L S C C L T V V S F Y  
 201 CCAGGTGCC GCCCTGCARG GGRACCTGGC CAGCCTCCGG GCAGAGTGC AGGCCACCA CCGGAGAG CTGCCAGCAG GAGCAGGAGC CCCAAGGCC  
 GGTCCACCCG CCGGACGTTT CCTTGGACCG GTCCGAGGCC CBTCTGACG TCCCGTGGT GCGCCTCTC GCGGTCTG CTCGTCTCTG GGGTTCGG  
 68 Q V A A L Q G D L A S L R P E L Q G H H A E K L P A G A G A P K A  
 301 GGCTTGAGG AAGCTCCAGC TGTACCCGG GACTGAAA TCTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAGGCA ACTCCRGTC GAACAGCAGA AATARGCGTG  
 CCGRACCTCC TCGAGGTGG ACAGTGGCC CCTGACTTT AGAARACTGG TGGTCGAGT CTTCTCCGT TGGGTCTGT TATTCGCRC  
 101 G L E E A P A V T A G L K I F E P P A P G E G N S S Q N S R N K R A  
 401 CCGTTCAGG TCACAGAAA ACAGTCTCTT AGACTGCTT GCACTGATT GCAGACAGT GAACACCAAC TATACAAAA GGATCTTACA CATTGTCTCC  
 GGCARGTCC AGGTCTCTT TGTCTGTAG TTCTGACGAA CCGTACTAA CCGTCTGTCAC TTGTGGTTG ATATGTTTT CCTAGRATGT GTAACARGG  
 135 V Q G P E E T V T Q D C L Q L I A D S E T P T I Q K G S Y T F V P  
 501 ATGGCTTCTC AGCTTAAA GGGGARGTC CCTAGHAAA AAGAGATA AATATTGGT CAAGAARCT GGTACTTTT TTATATATGG TCAGGTTTTA  
 TACCGRAGG TCGRAITTT CCCCCTCAG GATCTCTT TTCTCTAT TTATAPCCA GTTCTTTGA CCAATGAAA AATATATACC AGTCCRAAT  
 168 N L L S F K R G S A L E E K E N K I L V K E T G Y F F I Y G Q V L  
 601 TAPACTGATA AGACTACGC CRTGGACAT CTAAITCAGA GGAAGAGGT CCACTCTTI GGGATGAAI TGAATCTGGT GACTTGTIT CAGTGTATTC  
 ATATGACTAT TCIGGATCG GIACCCCTGA GATTARGTCT CCTCTTCCA GGTAGHAAA CCGTACTTA ACTCRAGCCA CTGAACAAA GCTACATAAG  
 201 Y T D K T Y A M G H L I Q R K K V H V F G D E L S L V T L F R C I Q  
 701 AANAATGCC TGAACACTA CCGATART CCTGCTATC AGCTGGATC GCAARACTGG PAGAAGAGA TGAACCTCAA CTTGCAATAC CRAAGAAAA  
 TTTTATACGG ACTTTGTGAT GGGTTATTA GACGATPAG TCGACCGTAA CCGTTGACC TTCTCTCTCT ACTGAGGT GAACGTTAG GTTCTCTTT  
 235 N M P E T L P N S C Y S A G I A K L E E G D E L Q L A I P R E N  
 801 TGACAAATA TCACITGATG GAGATGTCAC ATTTTTGGT GCATTGAAC TGCTGTA  
 ACGTCTTAT AGTACCTAC CTCTACAGT TAARARCCA CGTACTITG ACCRACI  
 268 A Q I S L D G D V T F F G A L K L L O

FIG.-3

1 GGTACGAGGC TTCTAGAGG GACTGGAAC TAATCTCCT GAGGTGAGG GAGGTGGAG GGTCTCARGG CACGGCTGGC CCCACGACGG AGTGCCAGGA  
 CCATGCTCCG AAGGATCTCC CTGACCTTGG AATAGAGGA CTCGGACTCC CTTCCRCCTC CCAGAGTTCC GTTGGACCCG GGGTGTGCC TCROGGTCTC  
 101 GCACTAACAG TACCCTTAGC TTGCTTTCC TTTTATTTT AAGTCTCTT TTTATTTCTC TTGCTAACA ACCTTCTCC CTTCGACCC  
 CCTGATTGTC ATGGGATCG AACGAARGA GAGGGGAGG ARAATPAAG TTCAAGGARA AATAAARGG AACCATTGT TGGAGAAGG GAAGACGGG  
 201 ACTGCCCGTA CCCTTACC GCGCCACC TCCTTGCTAC CCACCTCTG AABCCACAGC TGTGGCAGG GTCCCCAGCT CATGCCAGCC TCACTCTCCT  
 TGAACGGCAT GGAATGGC GGGGGCTGG AGAACCATG GGTGAGAC TTTGGTCTC ACACCGTCC CAGGGTCCA M P A S S P F  
 1  
 301 TCTTCTAGC CCCRAAGG CCTCCAGGA ACATGGGGG CCTAGTCAGA GAGCCGCCAC TCTCAGTTG CCTTGGTTG AGTTGGGGG CAGCTCTGG  
 AGAACGATCG GGGTTTCCC GGAGTCCGT TGTACCCCC GGTTCAGTCT CTCGGCCGTG AAGTCAACG GGAGCCAAC TCAACCCCC GTCGAGACCC  
 8 L L A P K G P F G N M G G P V R E F A L S V A L W L S W G A A L G  
 401 GCGGTGGCT TGTCCATGG CTCTGCTGAC CCAACRACA GAGCTGAGA CCTCAGGAG AGAGTTCAGC CGCTTCAGG GGACGAGG CCCCTCCCAG  
 CCGGACCGA ACACGGTACC GAGACGACTG GGTGTTTGT CTCGACTCT CCGAGTCTC TCTCCACTCG GCCGAGTCC CCTGTCTCC GGGGAGGTC  
 41 A V A C A M A L L T Q Q T E L Q S L R R E V S R L Q G T G G P S Q  
 501 AATGGGAG GGTATCCCTG GCAGTCTC CCGAGCAGA GTTCCGATC CCTGAGCC TGGAGAATG GGGAGATC CCGAARAGG AGAGCAGTGC  
 TTACCCCTC CCATAGGAC CGTCTCAGG GGCCTGACT CAAGCTCAG GGCCTTGG ACCCTTAC CCTCTCAG GGCCTTTCC TCTCGTCCG  
 74 N G E G Y P W Q S L P E Q S S D A L E A W E N G E R S R K R R A V L  
 601 TCACCCAAA ACAGAAGAG CAGCACCTG TCCTGCACCT GGTCCACCT AACGCCACT CCAAGGATG CTCGGATG ACAGAGGTA TGTGGCACC  
 AGTGGTTTT TGTCTTCTC GTCGTGAGC AGGACGTGA CCRAGGTA TCGGCTGA GTTCCCTACT GAGGCIACAC TGTCTCCACT ACACCGTTGG  
 108 T Q K Q K K Q H S V L H L V P I N A T S K D D S D V T E V M W Q P  
 701 AGCTCTTAGG CGTGGAGAG GCCTACAGC CCAAGGATAT GGTGTCGAA TCCAGGATG TGGAGTTAT CTGCTGTATA GCCAGTCTT GTTCCAGAC  
 TCGAGAATCC GCACCCCTC CCGATGTCG GGTCTCTATA CCACAGGTT AGTCCCTACG ACCTCAATA GACGACATAT CCGTCCAGG CAAGTTCTG  
 141 A L R R G R G L Q A Q G Y G V R I Q D A G V Y L L Y S Q V L F Q D  
 801 GTGACTTCA CCAAGGTTCA GGTGGTCT CGAGAGGCC AAGGAGGCA GAGACTCTA TTCGATCPA TARGAGTAT GCCCTCCCAC CCGGACCCGG  
 CACTGAAAGT GGTACCAGT CCACCACAGA GCTCTCCGG TTCCTCCGT CCTCTGAGT AAGGCTACAT ATTCTTCAVA CCGGAGGTTG GSCCTGGCCC  
 174 V T F T M G Q V V S R E G Q G R Q E T L F R C I R S M P S H P D R A  
 901 CCTACAACAG CTGCTATAGC GCAGGTGCT TCCATTTACA CCAAGGGAT ATTCTGATG TCATATTC CCGGGCAGG CGGAACCTA ACCTCTCTCC  
 GGATGTTGTC GACGATATCG CGTCCACAGA AGGTAATGT GGTCCCTTA TAAGACTCAC AGTATTAGG GCGCCGTTCC CGCTTTGAT TGGAGAGGG  
 208 Y N S C X S A G V F H L H Q G D I L S V I I P R A R A K L N L S P

FIG. 4A

1001 ACATGGRACC TTCCCTGGGT TTGTGAACT GTGATTGTGT TATAAARAAGT GGCTCCAGC TTGGAAGACC AGGGTGGSTA CATRCTGGAG ACAGCCAAGA  
 TGTACCTTGG AAGGACCCCA PACACTTTGA CACTAACACA AATATTTTCA CCGAGGGTGG AACCTTCTGG TCCCACCCAT GTATGACCTC TGTGGTTCT  
 241 H G T F L G F V K L O  
 1101 GCTGAGTATA TAAAGGAGAG GGAATGTGCA GGAACAGAGG CATCTTCTG GGTGCTC ACTTTTCCCT TTTCATTCCC ACCCCCTAGA  
 CGACTCATAT ATTTCTCTC CATTACAGT CCTGTCTCC GTAGAAGAC CCAACCCGAG GGCACAGG TGAARAGGA AAGTAAGGG TGGGGATCT  
 1201 CTTTGATTT ACGGATACT TCTTCTGT CCCCATGGAG CTCGAATC TTGGGTGT GTAGATGAG GCGGGGAC GGGCGCCAGG CATTGTTGAG  
 GAAACTAAA TGCCTATAGA ACGAAGACRA GGGTACTC GAGGCTTAG AACGCACACA CATCTACTCC CCGCCCCCTG CCGCGGTCC GTAACAATC  
 1301 ACCTGGTGG GCGCCACTGG AAGCATCCAG AACAGACCA CCATCTTA  
 TGGACCAGCC CCGGGTGACC TTCGTAGGTC TTGTCGTGGT GGTAGAT

**FIG.-4B**

TACIs

agcatcctgagtaATGAGTGGCCTGGGCGGAGCAGGCGAGGTGGCCGGAGCCGTGTGGACCAGG
AGGAGCGctGGTCACTCAGCTGCCGCAAGGAGCAAGGCAAGTCTATGACCATCTCCTGAGGGAC
TGATCAGCTGTGCCTCCATCTGTGGACAGCACCCCTAAGCAATGTGCATACTTCTGTGAGAACAA
GCTCAGGAGCCCAGTGAACCTTCCACCAGAGCTCAGGAGACAGCGGAGTGGAGAAGTTGAAAACA
ATTCAGACAACCTCGGGAAGGTACCAAGGATTGGAGCACAGAGGCTCAGAAGCAAGTCCAGCTCTC
CCGGGGCTGAAGCTGAGTGCAGATCAGGTGGCCCTGGTCTACAGCACGCTGGGGCTCTGCCCTGTG
TGCCGTCCTCTGCTGCTTCCCTGGTGGCGGTGGCCTGCTTCCCTCAAGAAGAGGGGGGATCCCTGCT
CCTGCCAGCCCCGCTCAAGGCCCGTCAAAGTCCGGCCAAAGTCTTCCCAGGATCACGCGATGGAA
GCCGGCAGCCCTGTGAGCACATCCCCGAGCCAGTGGAGACCTGCAGCTTCTGCTTCCCTGAGTG
CAGGGCGCCCCACGCAGGAGAGCGCAGTCACGCCTGGGACCCCCGACCCCACTTGTGCTGGAAGGT
GGGGGTGCCACACCAGGACCACAGTCTGCAGCCTTGCCACACATCCCAGACAGTGGCCTTGGC
ATTGTGTGTGTGCCTGCCAGGAGGGGGGGCCAGGTGCATAAatgggggtcagggagggaaagga
ggagggagagagatggagaggaggggagagagaaagagaggtggggagaggggagagagatatga
ggagagagagacagaggaggcagaaaaggagagaaacagaggagacagagagggagagagagaca
gagggagagagagacagaggggaagagaggcagagaggggaaagaggcagagaaggaaagagacag
gcagagaaggagagaggcagagagggagagaggcagagagggagagaggcagagagacagagagg
gagagagggacagagagagatagagcaggaggtcggggcactctgagtcccagttcccagtgca
ctgtaggtcgtcatcacctaaccacacgtgcaataaagtccctcgtgctgtgctcacagcccc
gagagccccctcctcctggagaataaaaaccttggcagctgccttccctcaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaa

FIG.\_5A

TACIs :

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERWSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCSASICGQHPKQCA YFCENKLRSP
VNLPEELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEAS PALPGLKLSADQVALVYSTLGLCLCAVLC
CFLVAVACFLKKRGDPCSCQPRSRFRQS PAKSSQDHAMEAGSPVSTSPPEVETCSFCFPECRAPT
QESAVTPGTPDPTCAGRWGCHTRTTVLQPCPHIPDSGLGIVCVPAQEGGPG

FIG.\_5B

BR3 humano :

cgctggcaccATGAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGGCAGGGACGCGCCAGCCCCAGCCCT
CGCTCCCGGCCGAGTGTCTCGACCTGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGCAGC
CCGCGGCCGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCCGCCAGGACGGCGCTGCAGCCGAGGAGTCT
GGTGGGCGCGGGGGCCGGCAGGCGGCTGCCCTGCCCGGGCTGCTCTTTGGCGCCCCCGCGC
TGCTGGGCTTGGCACTGGTCTGGCGCTGGTCTGGTGGGTCTGGTGGAGCTGGAGGCGGCGACAG
CGGCGGCTTCCGCGCGCGTCTCCTCGCAGAGGCCCCCGACGGAGACAAGGACGCCCCAGAGCCCT
GGACAAGGTCATCATTCTGTCTCCGGGAATCTCTGATGCCACAGCTCCTGCCTGGCCTCCTCCTG
GGGAAGACCCAGGAACCACCCACCTGGCCACAGTGTCCCTGTGCCAGCCACAGAGCTGGGCTCC
ACTGAACTGGTGAACCACCAAGACGGCCGGCCCTGAGCAACAATAGcagggagccggcaggaggtg
gccccctgccc

FIG.\_6A

BR3:

MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGA
GAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLA LVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGDKDAPEPLDKV
IILSPGISDATAPAWPPPGE DPGTTPPGHSVPVPATEL GSTELVTTKTAGPEQQ

FIG.\_6B

BR3 murino:

**ATGGGCGCCAGGAGACTCCGGGTCCGAAGCCAGAGGAGCCGGGACAGCTCGGTGCCACCCAGTG**  
**CAATCAGACCCGAGTGCTTCGACCCCTCTGGTGAGAACTGCGTGTCTGTGAGCTCTCCACACGC**  
**CGGACACTGGACATACAAGCAGCCTGGAGCCTGGGACAGCTCTGCAGCCTCAGGAGGGCTCCGCG**  
**CTGAGACCCGACGTGGCGCTGCTCGTGGTGGCCCCGCACTCCTGGGACTGATACTGGCGCTGAC**  
**CCTGGTGGGTCTAGTGAGTCTGGTGAGCTGGAGGTGGCGTCAACAGCTCAGGACGGCCTCCCCAG**  
**AACTTCAGAAGGAGTCCAGCAAGAGTCCCTGGAAAATGTCTTTGTACCCTCCTCAGAAACCCCT**  
**CATGCCTCAGCTCCTACCTGGCCTCCGCTCAAAGAAGATGCAGACAGCGCCCTGCCACGCCACAG**  
**CGTCCCGGTGCCCGCCACAGAACTGGGCTCCACCGAGCTGGTGACCACCAAGACAGCTGGCCAG**  
**AGCAATAGcagcagtgaggctggaaccagggatctctactgggcttgaggacttcaaccaaca**  
**gcttgggaaagaacttggccttcagtgacggagtcccttgcctggggggcgaaccggcagaac**  
**cagacactacaggocacatgagattgcttttggttagctcttgacttgagaacgttccatttct**  
**gagatggtttttaagcctgtgtgccttcagatggttggatagacttgagggttgcatatttaatc**  
**tctgtagtgagtcgggagactggaacttaatctcgttctaaaaatttggattactgggctggag**  
**gtatggctcagcagttcggttgggtgctgttctagccgaggactccagttgctcagctcccgg**  
**aactcagatctggcagcttaagaccctgtcactccagcccctggaacatecttgcctccaag**  
**gcaccagcactgat ttgctctagagcacacacacacacacacacacacacacacacacacaca**  
**cacatatgcatgcatgcacacttaaaaatgtcaaaattagcggctggagaaattcatggtcaaca**  
**gcgcttactgtgattccagaggatgagagtttgattcccagaatgcactgcgggtggctcattac**  
**tgagcataacttttgcttcaggggacctgatgcctctggacttcatgggcatctgtattcacgtg**  
**cacatectacacacacacacacacacacacacacacacacacacactcttttaaaaatg**  
**ataaaaataaagatgggcatgggtggtacacactttaatcccaacattggggaagcaaaggcagg**  
**caggtaaatgagttggaggccatcctggtctacatagcaagttccaggotaaccagagctaaatg**  
**gtgagaccaagtctcaaaaataactccccccccaaaaaaaacttttaaattttgatttttt**  
**tcttttattatttttttatattaatttcatgggtgtttagaagtggatatacttagatgggtgact**  
**aagaggaggtaaagccatcaggactgagcccctaacatacaaggagaaagcagagacaatgaaca**  
**cgcccctctcctgctgtgtgcccagctctggaccaccagccagagggaatcatcagatgtgggcc**  
**ctagaaccttcagagccgaaagctaaatcaatctcatttctttgtaagctatttagccttaggt**  
**gttttgttacggtgatataaaaatggaactaacacaggcactatgagtaagaagcttttcttgagc**  
**tgggaaaggtactgttaaaccaaaat taatctgaataaaaaaggctaaggggaagcactt**

**FIG. 6C**

PRO XXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 aminoácidos)

Proteína de comparación XXXXXYYYYYYY (Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos exactamente coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 15 = 33,3 %

**FIG.\_7A**

PRO XXXXXXXXXX (Longitud = 10 aminoácidos)

Proteína de comparación XXXXXYYYYZZYZ (Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos exactamente coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 10 = 50 %

**FIG.\_7B**

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

FIG.-8

	10	20	30	40
hBR3	M---	RRGPRSLRGRDAPAPT	PCVPAECFDLLVRHCVACGL	
mBR3	MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCEL			
		M...	R...RS.R.RD+..PT.C..+ECFD.LVR+CV+C.L	
	50	60	70	80
hBR3	LRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAALPLPGL			
mBR3	FHTP--DTGHTSSLEPGTALQPQE-----GSALRPDVAL			
		..TP.....+SS..P.TALQPQE.....G.A..P...L		
	90	100	110	120
hBR3	LFGAPALLGLALVLALV.LVGLVSWRRRQRRLRGASSAEA			
mBR3	LVGAPALLGLLILALTLVGLVSLVSWRWRQQ-LRTASP-DT			
		L.GAPALLGL.L.L+LV.LV.LVSWR.RQ+.LR.AS...+		
	130	140	150	160
hBR3	PDGDKDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTP			
mBR3	SEGVQQ--ESLENVFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSAL			
		..+G.+...E.L+.V+.S.....A+AP.WPP..ED...++.		
	170	180		
hBR3	PGHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQQ			
mBR3	PRHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQ			
		P.HSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQ.		

**FIG. 9**

Secuencia de CD20 humano que muestra regiones transmembrana  
(en cuadradas) y extracelular (subrayadas) predichas

	10	20	30	40	50
CD20.hu	MTTFRNSVNGTFFAEPKGP IAMQSGPKPLFRMSSLVGPTQSFMRK				
	60	70	80	90	100
CD20.hu	TLGAVQIMNGLFH <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">IALGGLLMIPAGIYAPICVTWYPLWGGIMYIISGSL</span>				
	110	120	130	140	150
CD20.hu	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LAATEKNSRKCLVKGMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILN</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">IKISHFLKME</span>				
	160	170	180	190	200
CD20.hu	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTOYCYSIQS</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LFLGILSVMLIF</span>				
	210	220	230	240	250
CD20.hu	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AFFQELVIA</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GIVENEWKRTCSPKSNIVLLSAEKKEQTIEIKEEVVGLT</span>				
	260	270	280	290	297
CD20.hu	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEETETNFPPEPPDQESSPIENDSSP</span>				

FIG. 10

## Figura 11

Secuencia de ADNc de CD20 humano

```
ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGGGACTTTCCCGGCAGAGCCAATGAAAGGCCCTAT
TGCTATGCAATCTGGTCCAAAACCACTCTTCAGGAGGATGTCTTCACTGGTGGGCCCCACG
CAAAGCTTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGGGCTGTCCAGATTATGAATGGGCTCTT
CCACATTGCCCTGGGGGGTCTTCTGATGATCCCAGCAGGGATCTATGCACCCATCTGTGTG
ACTGTGTGGTACCCTCTCTGGGGAGGCATTATGTATATTATTTCCGGATCACTCCTGGCAGC
AACGGAGAAAAACTCCAGGAAGTGTTTGGTCAAAGGAAAAATGATAATGAATTCATTGAGCC
TCTTTGCTGCCATTTCTGGAATGATTCTTCAATCATGGACATACTTAATATTTAAATTTCCCA
TTTTTAAAAATGGAGAGTCTGAATTTTATTAGAGCTCACACACCATATATTAACATATACAAC
TGTGAACCAGCTAATCCCTCTGAGAAAAACTCCCCATCTACCCAATACTGTTACAGCATACAA
TCTCTGTTCTTGGGCATTTTGTGAGTGATGCTGATCTTTGCCTTCTTCCAGGAAC TTGTAATA
GCTGGCATCGTTGAGAATGAATGGAAAAGAACGTGCTCCAGACCCAAATCTAACATAGTTCT
CCTGTCAGCAGAAGAAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAAAAGAAGAAGTGGTTGGGCTAA
CTGAAACATCTTCCAACCAAAGAATGAAGAAGACATTGAAATTATCCAATCCAAGAAGAGG
AAGAAGAAGAAACAGAGACGAACCTTTCCAGAACCTCCCAAGATCAGGAATCCTCACCAATA
GAAAATGACAGCTCTCCT
```

FIG. 12

Alineamiento de secuencias de dominio de cadena ligera variable

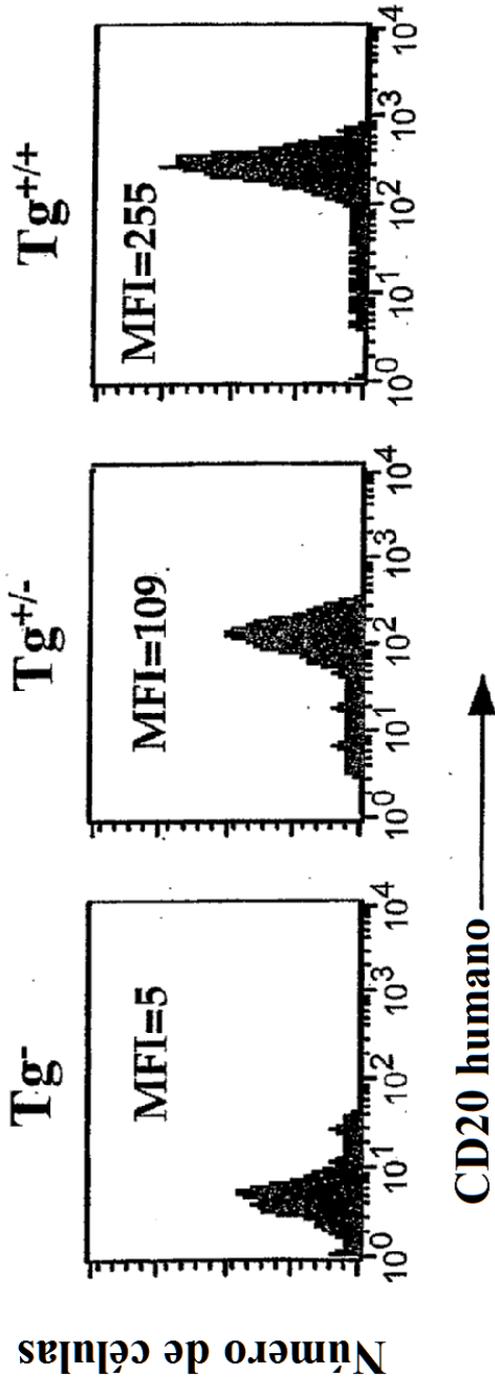
	10	20	30	40
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP	
	* *** ** * ** *			
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP	
		* * * **		
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA		
	** *	*	***	****
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	*	* * *		
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR		
	*	* * *		
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR		
		**** *		
hum KI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR		

FIG. 13

Alineamiento de secuencias de dominio de cadena pesada variable

	10	20	30	40
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT	*
	*** ** ** * * *** *			
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA	
		* * * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2H7	PRQGLEWIG [AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM		
	** *		** ** ** * *	
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL		
	* * **** * * ****		* *	
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100abcde	110
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWFYFDV]	WGTGTLVTVSS	
	** ** * *		* *	
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWFYFDV]	WGQGLVTVSS	
		***** ** *		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGLVTVSS	

**Expresión de transgen CD20 humano en células B220<sup>+</sup> de ratón**



**FIG. 14**

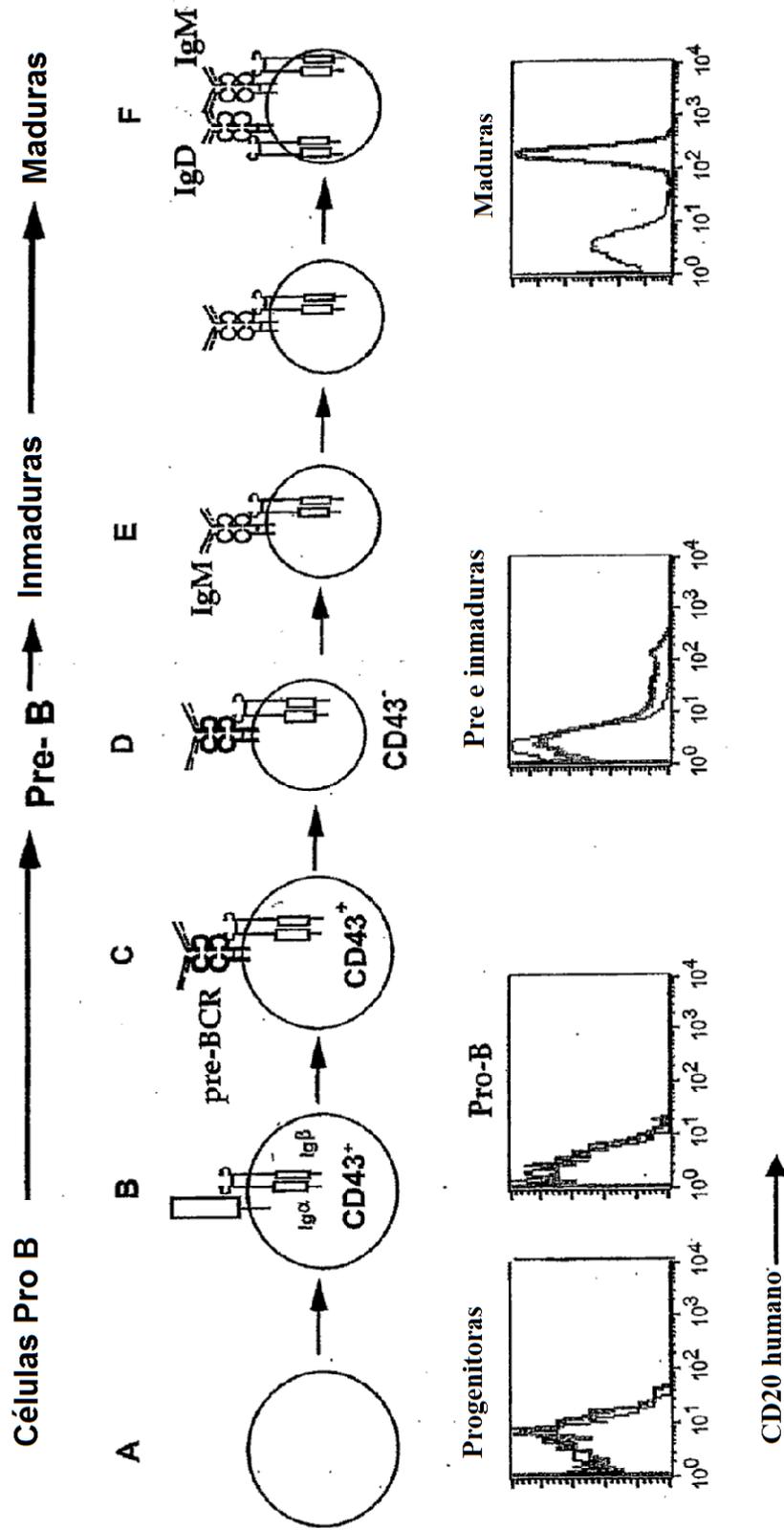


FIG. 15

# Expresión de CD20 humano en médula ósea de ratón Tg<sup>+</sup>

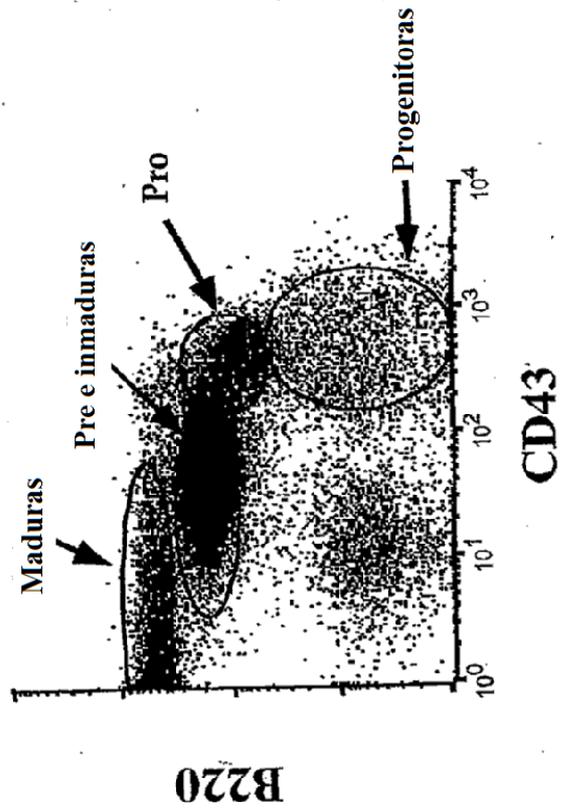
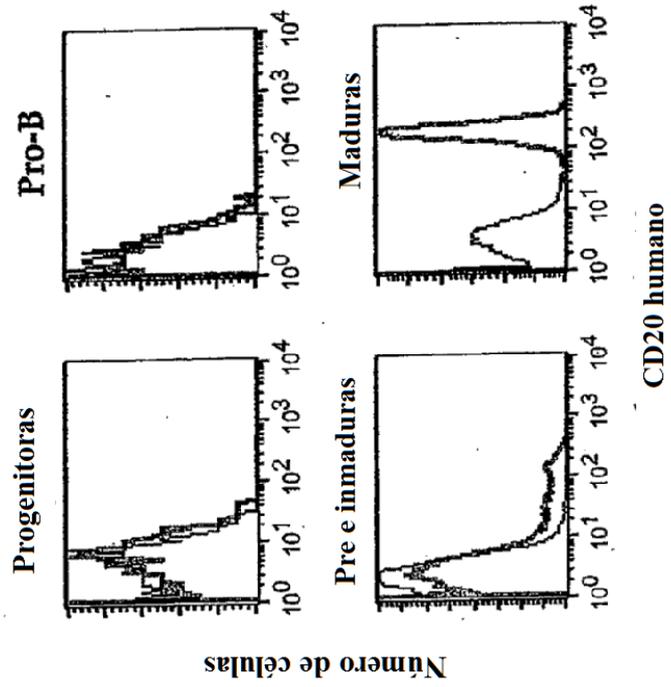


FIG. 16

Expresión de CD20 humano en células B esplénicas de ratón  $Tg^+$

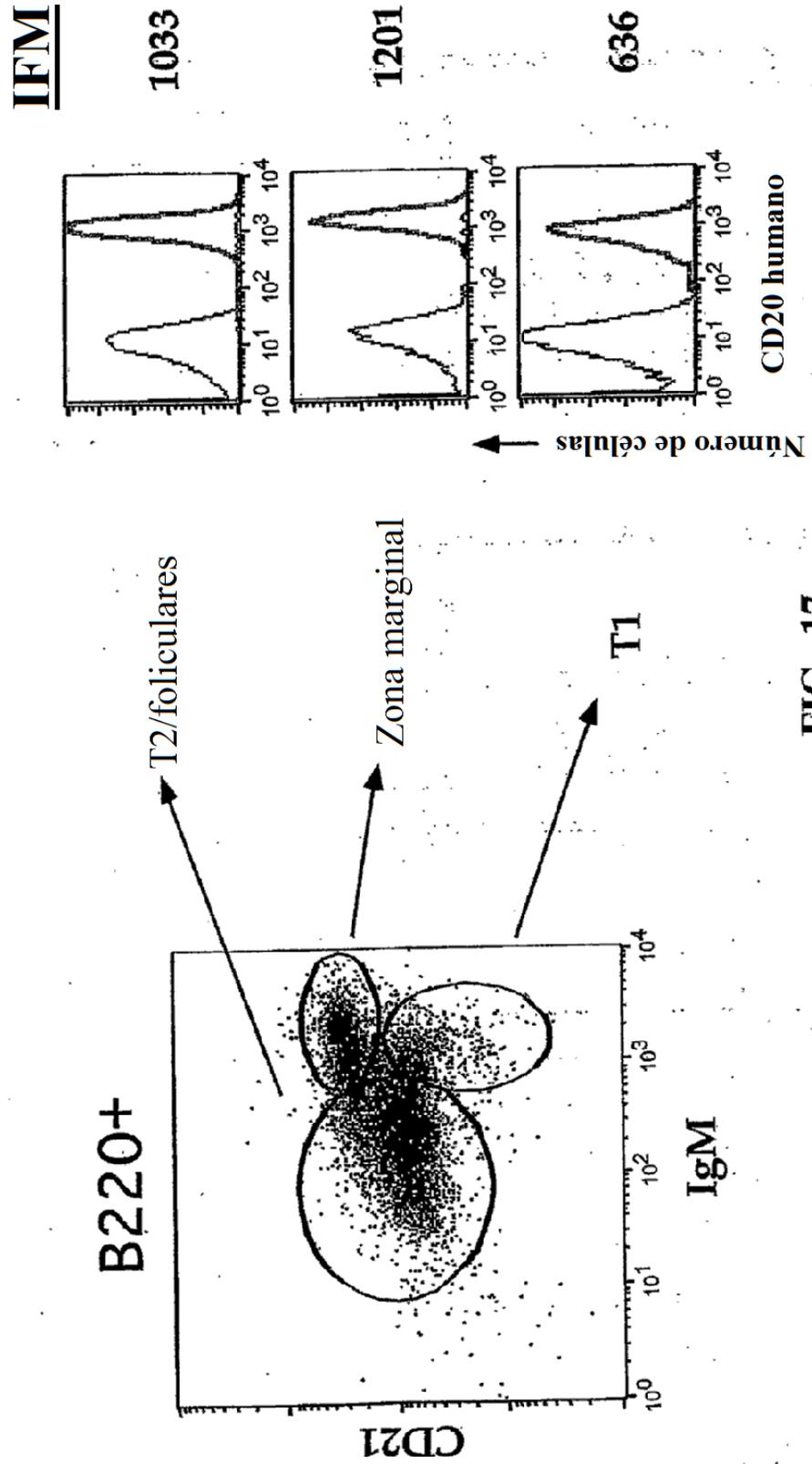


FIG.\_17

# Expresión de CD20 humano en LN mesentéricos Tg<sup>+</sup>

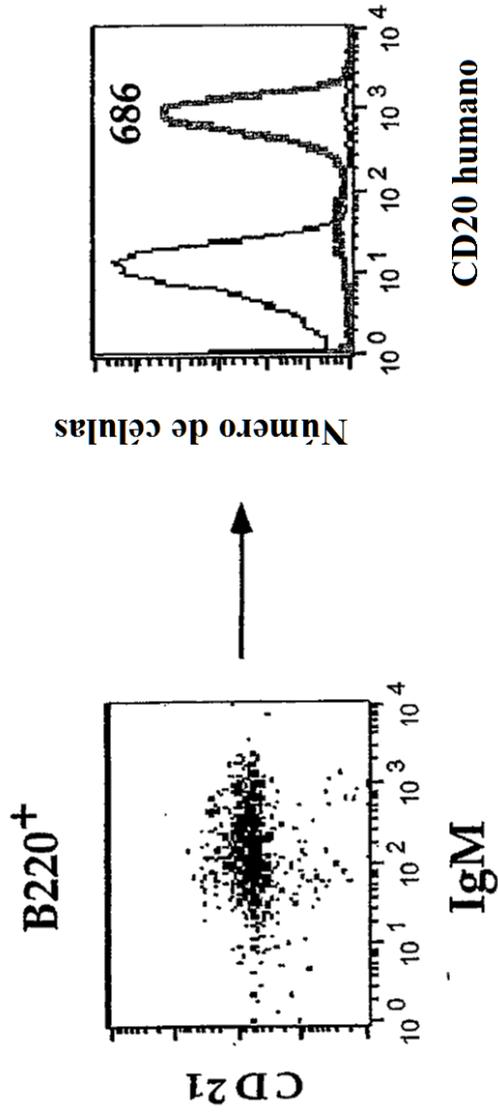


FIG.\_18

# Expresión de CD20 humano en placas de Peyer Tg<sup>+</sup>

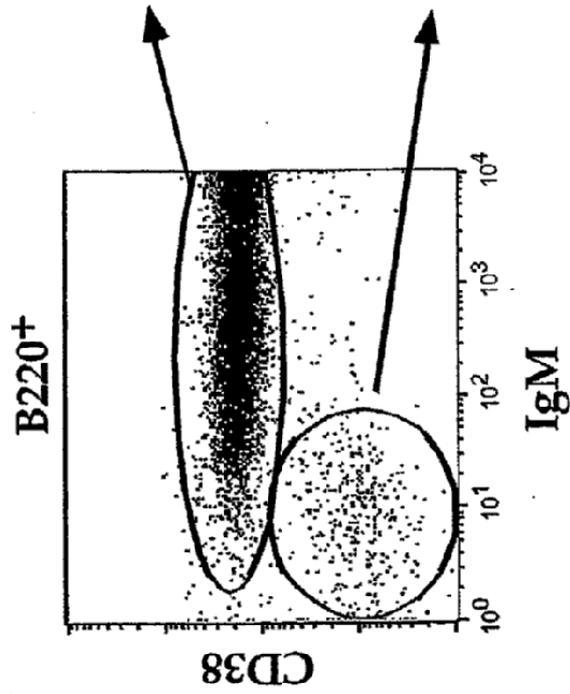
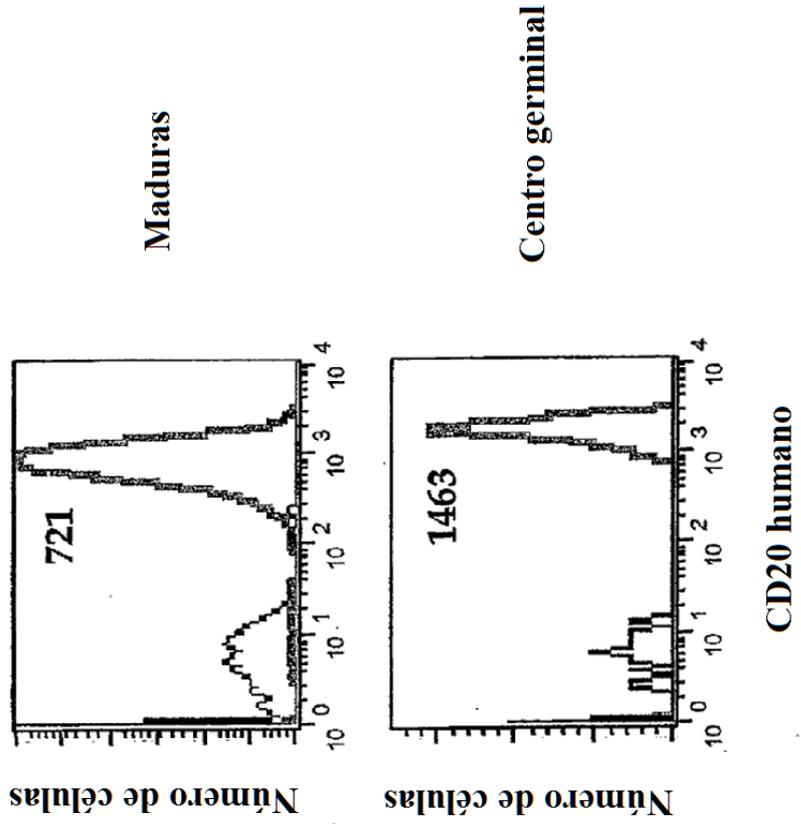
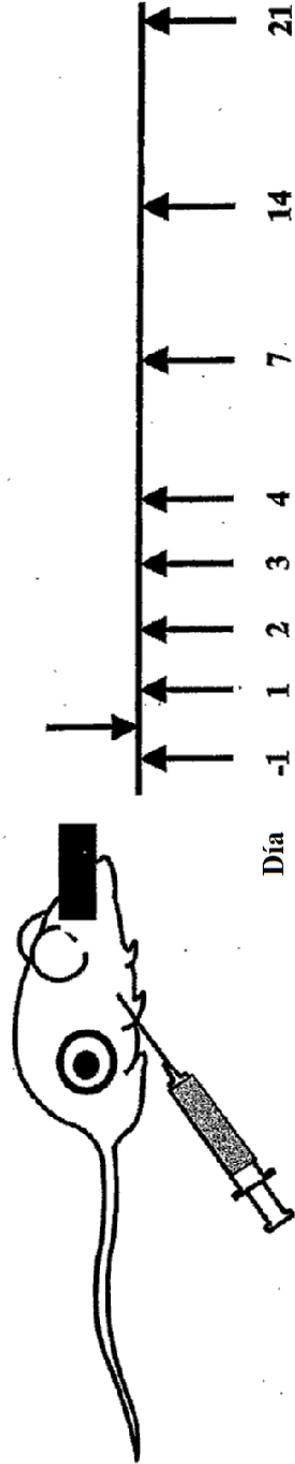


FIG.\_19

# Efectos del mAb anti-CD20 en ratones

1,0 mg de mAb anti-CD20 [≈50 mg/kg: 3,5 g para un hombre de 70 kg]



Día

21

14

7

4

3

2

1

-1

FACS

Sangre periférica

Bazo

LN

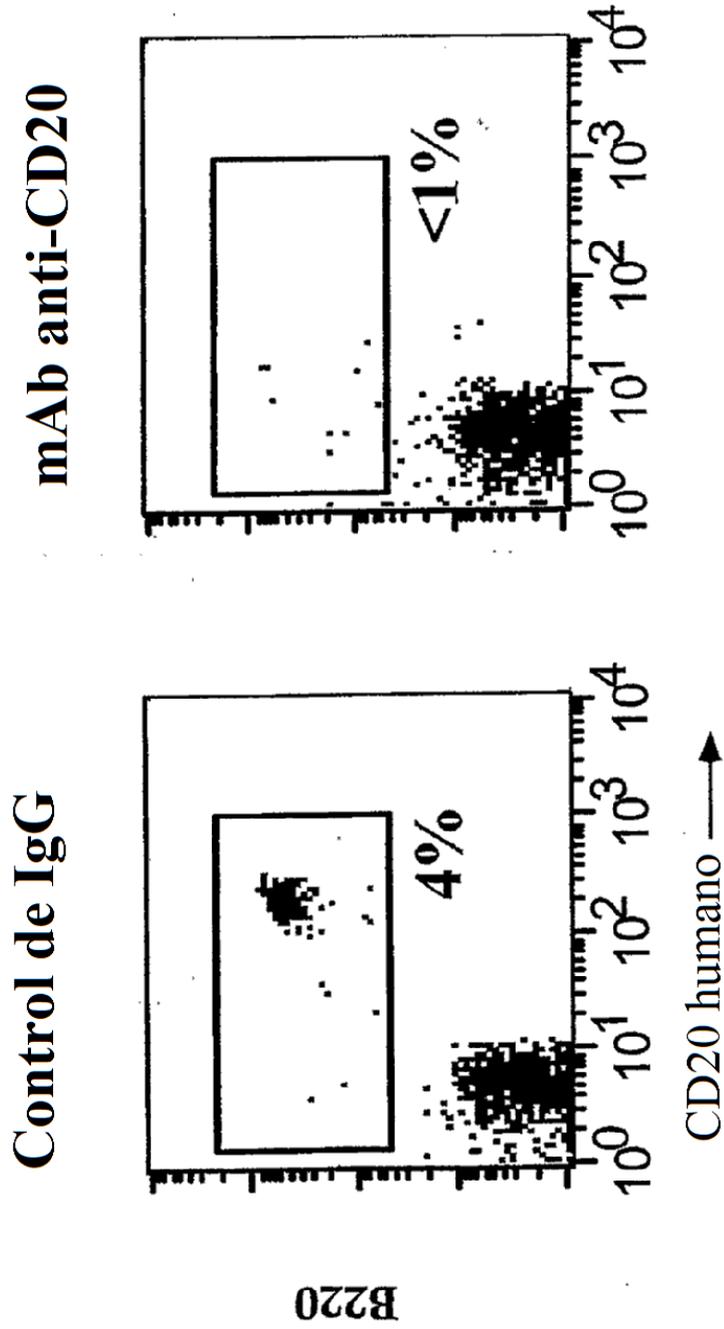
Médula ósea

Placa de Peyer

FIG.\_20

Niveles en suero de mAb anti-CD20

**Agotamiento de células B periféricas con mAb anti-CD20**



**FIG. 21**

Agotamiento de células B de LN periféricas maduras por mAb anti-CD20

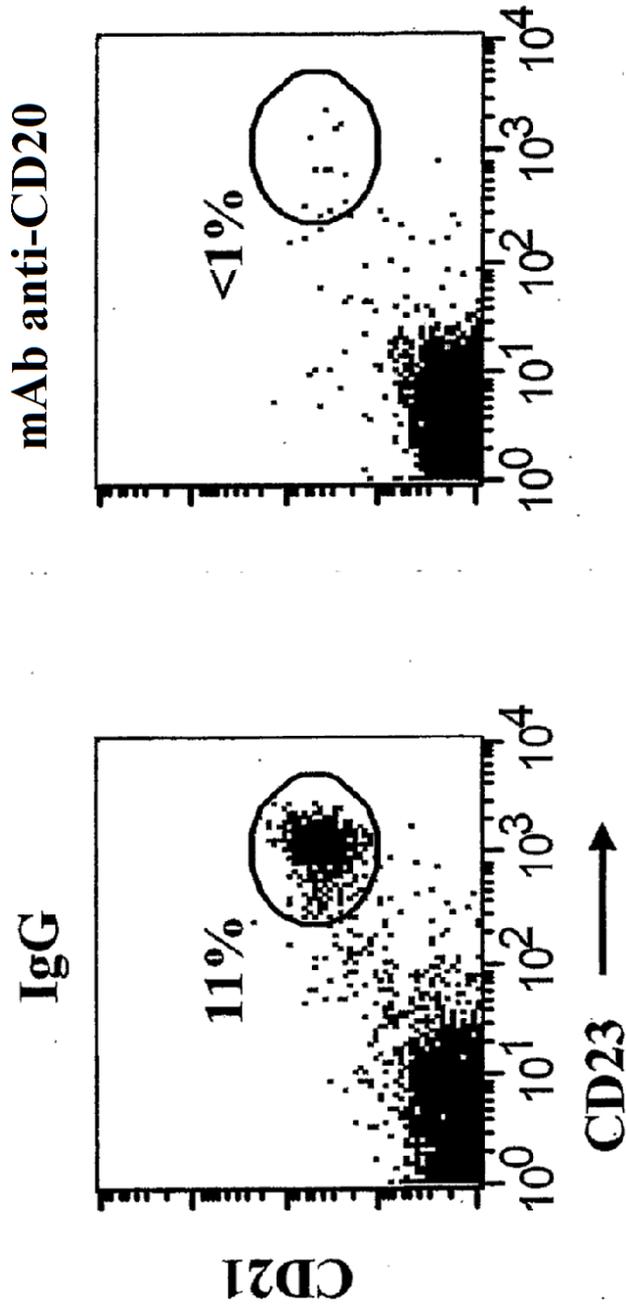


FIG. 22

Agotamiento de células B T2 esplénicas por mAb anti-CD20

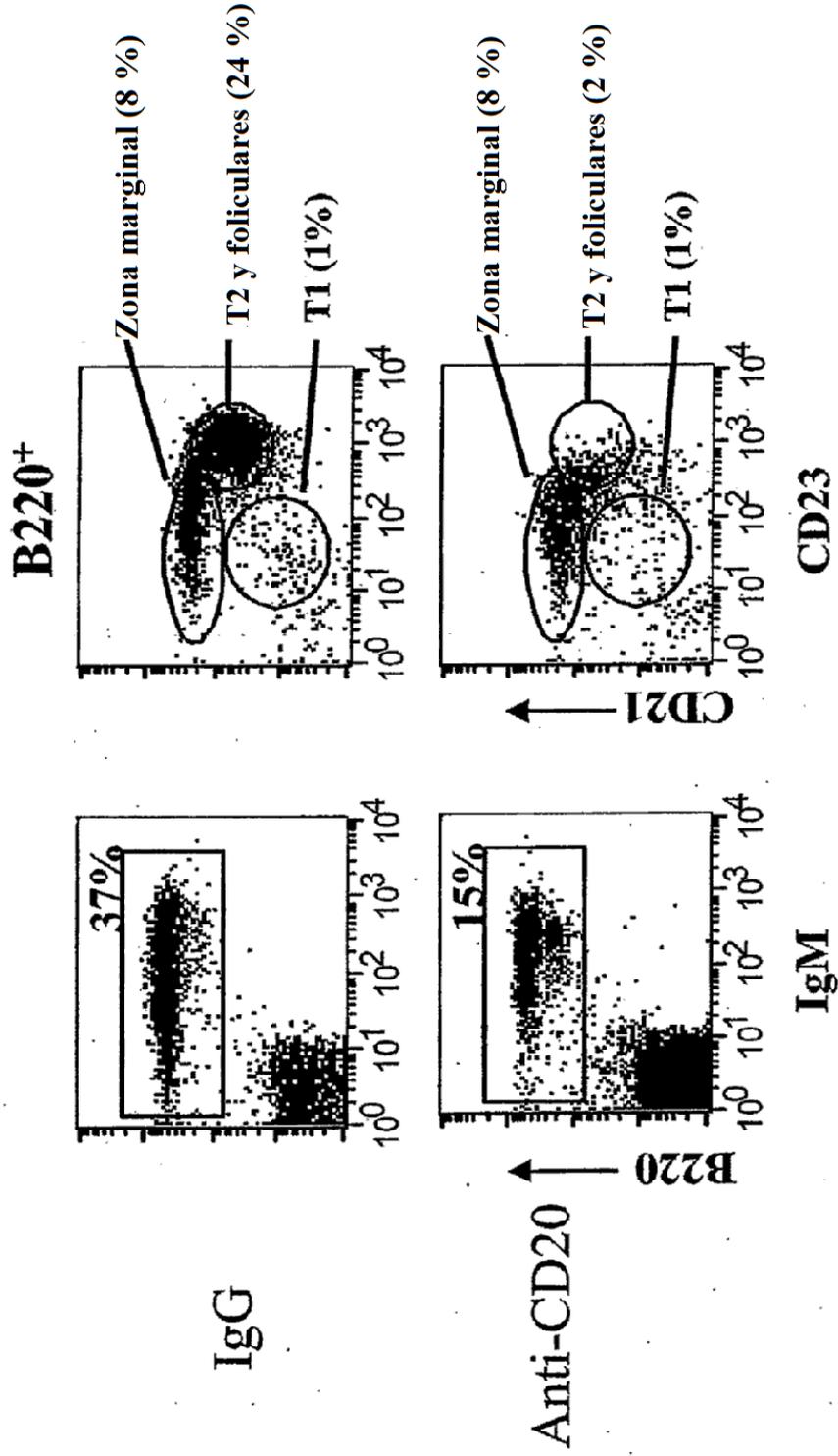


FIG.\_23

# Agotamiento de células B maduras en recirculación por mAb anti-CD20

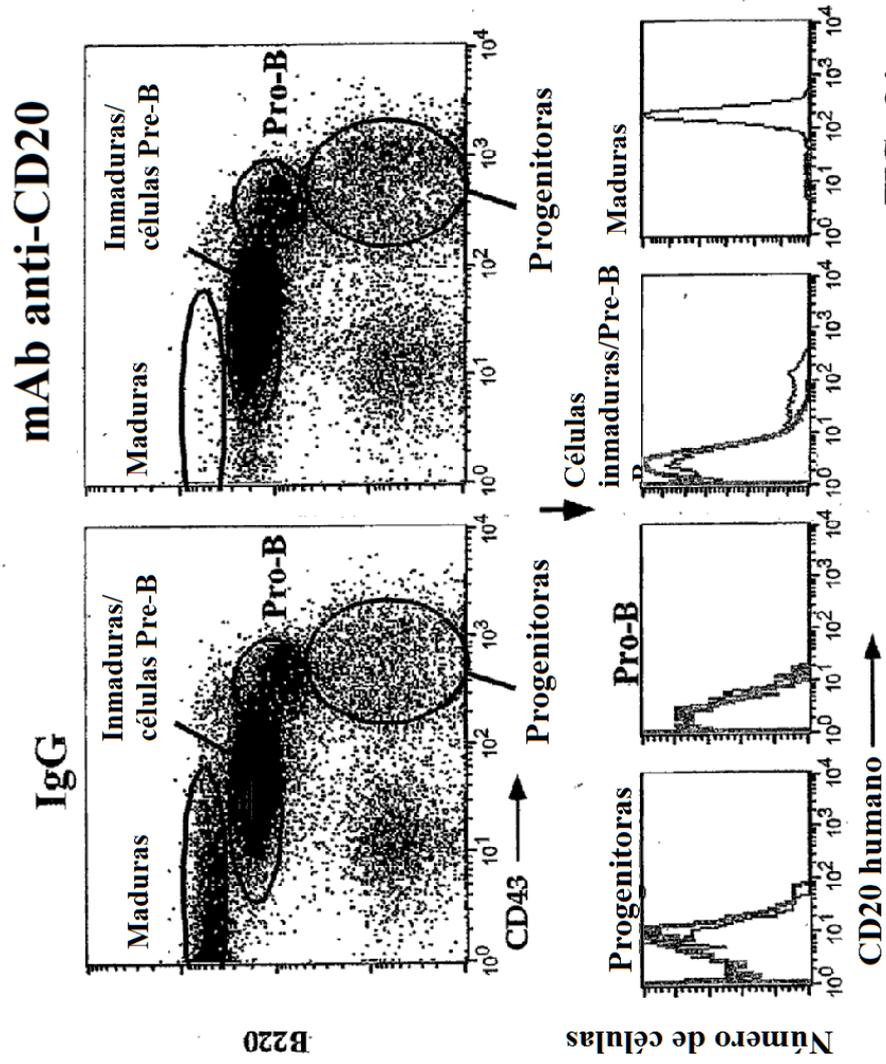


FIG. 24

Resistencia de células B del centro germinal de placas de Peyer  
a mAb anti-CD20

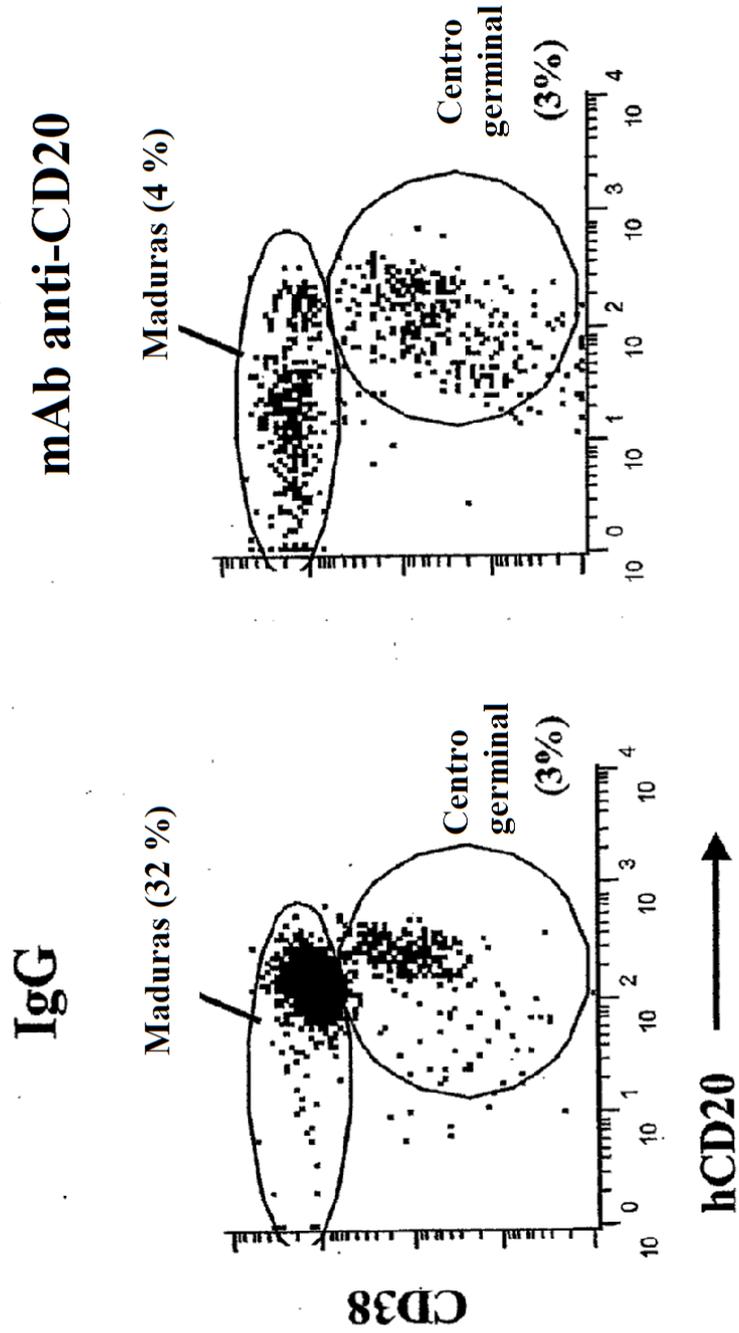
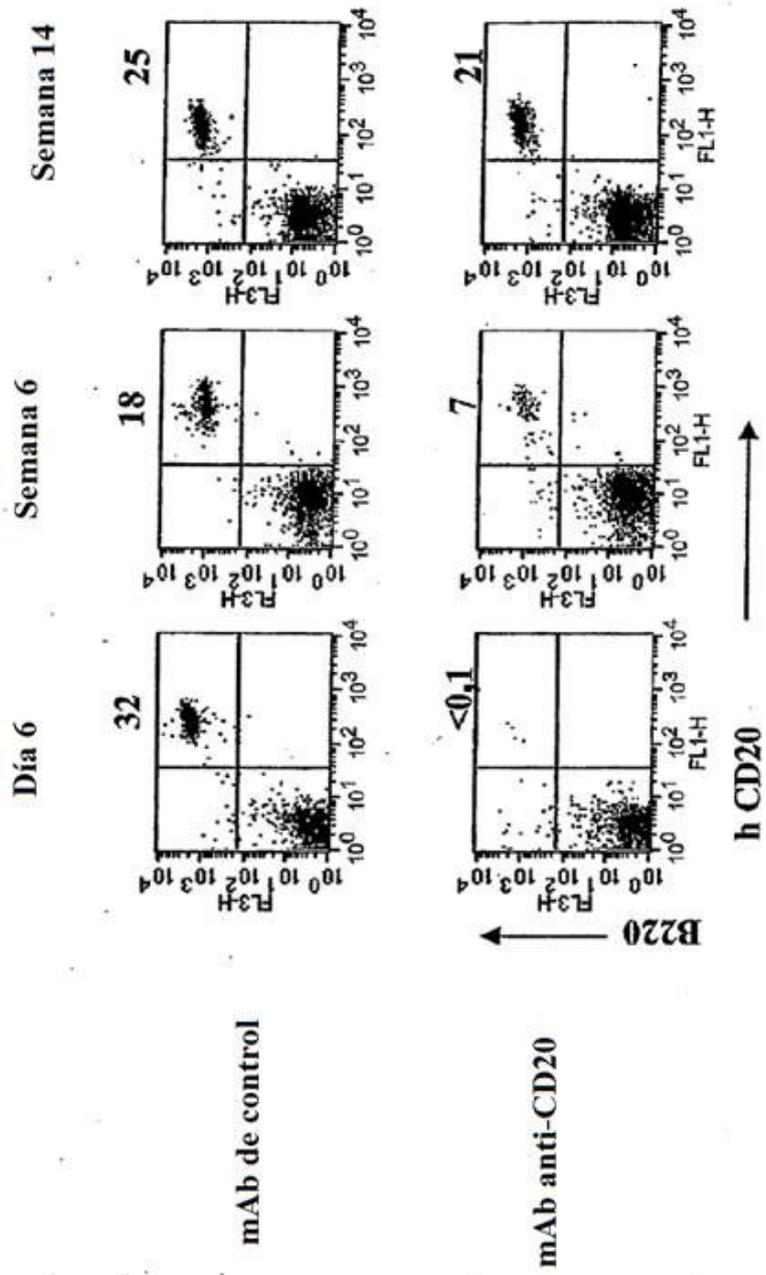


FIG.\_25

**Agotamiento y recuperación de células B después de Rx de mAb anti-CD20**



**FIG. 26**

# Resistencia de las células B de centro germinal esplénico a Rx de mAb anti-CD20 a corto plazo

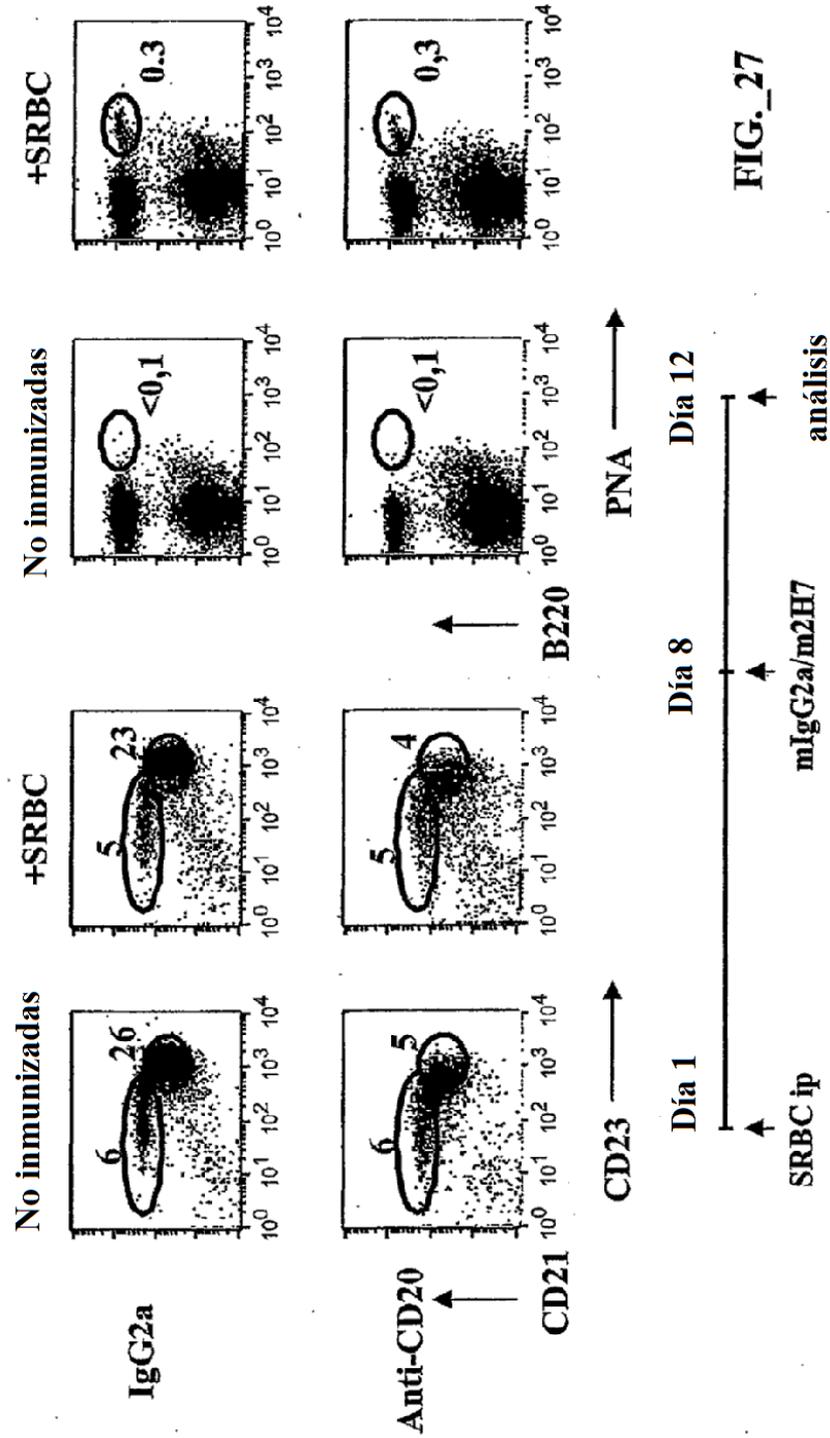
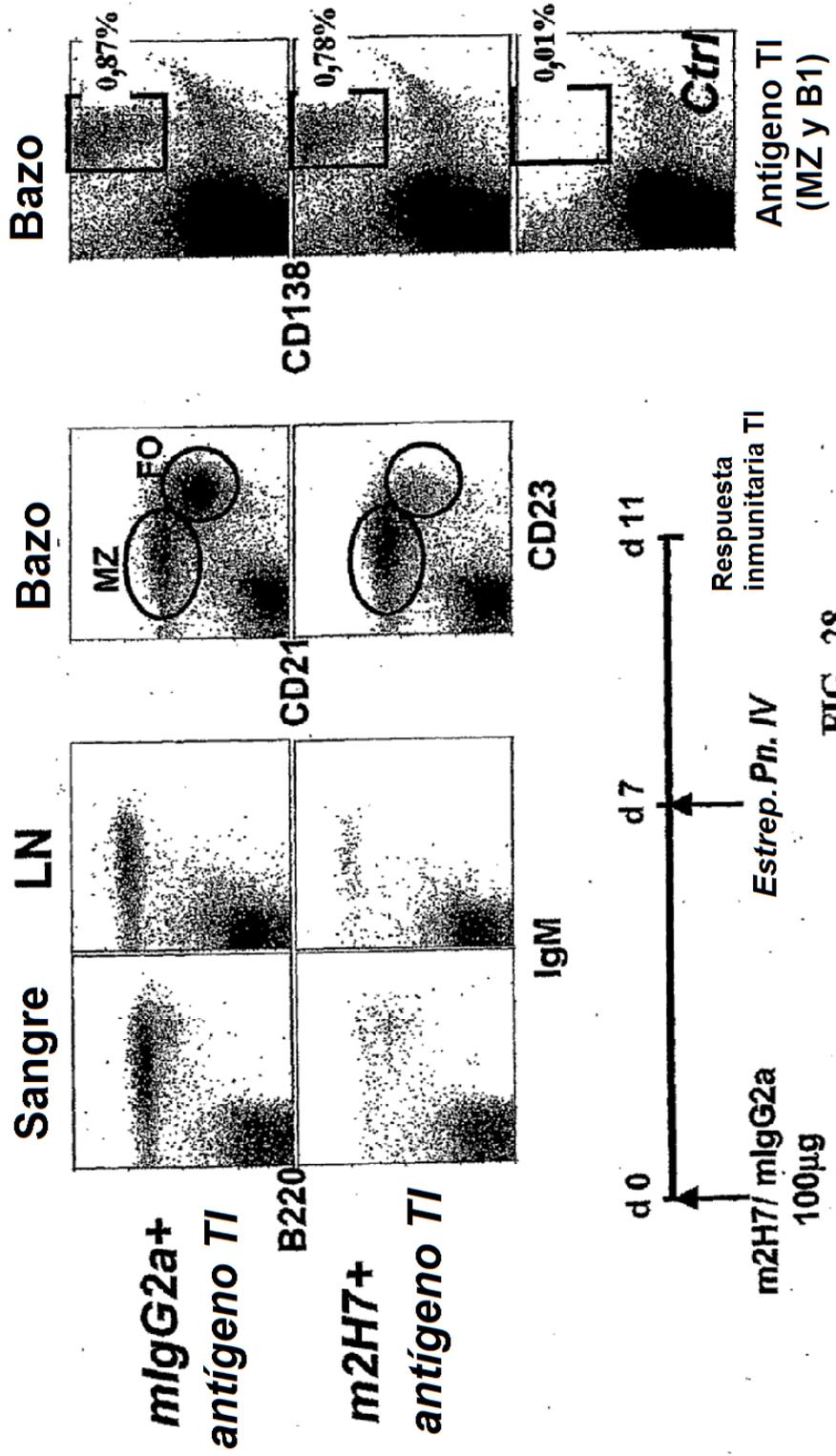


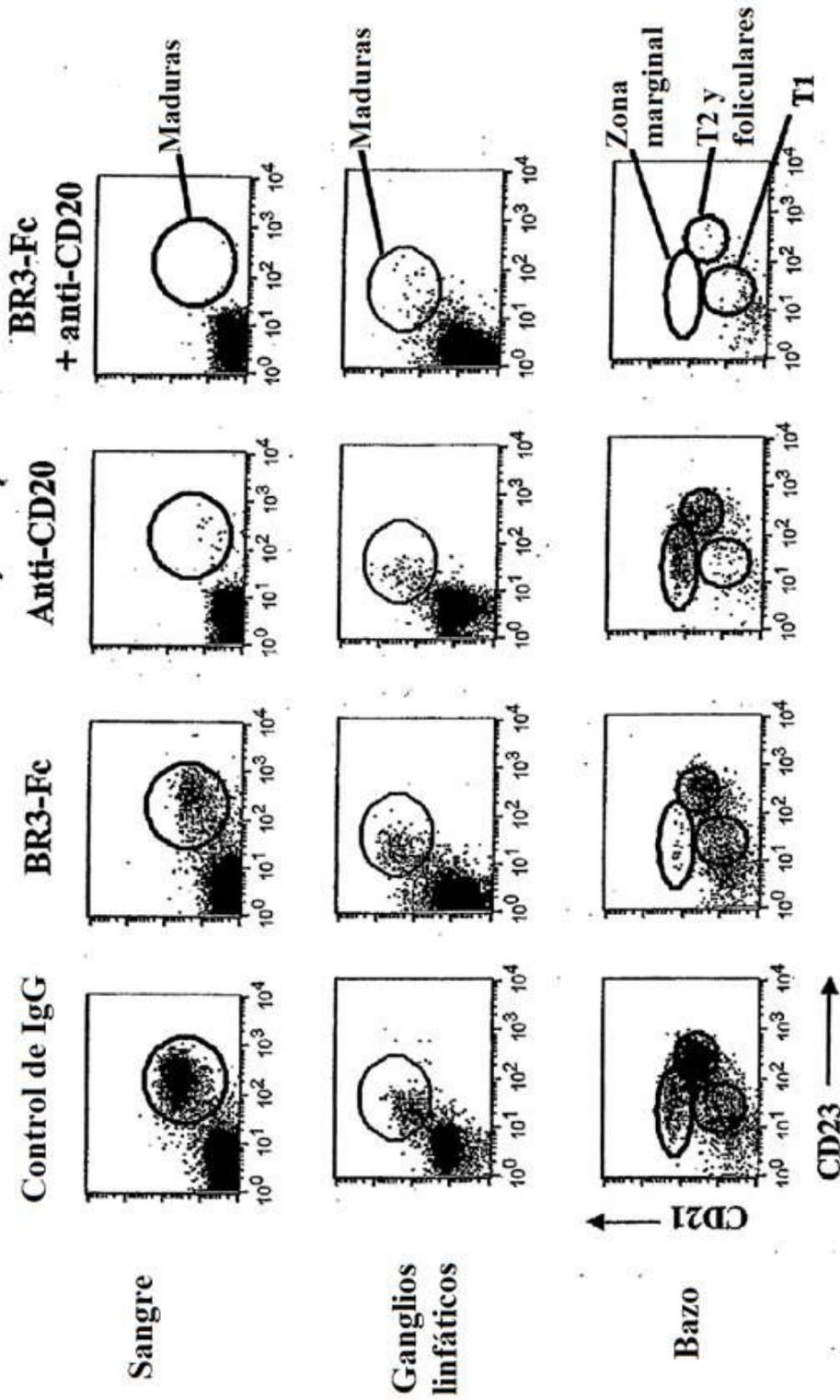
FIG. 27

**Células B MZ y B1 no agotadas confieren protección a antígenos independientes de T**



**FIG. 28**

**Efectos biológicos definidos de tratamiento con BR3 y mAb anti-CD20**



**FIG.\_29**

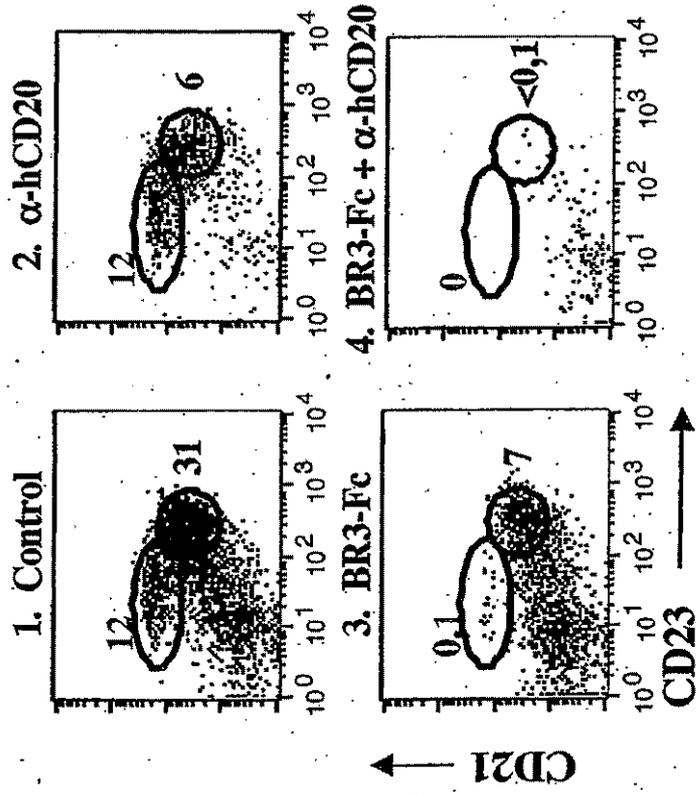


FIG. 30

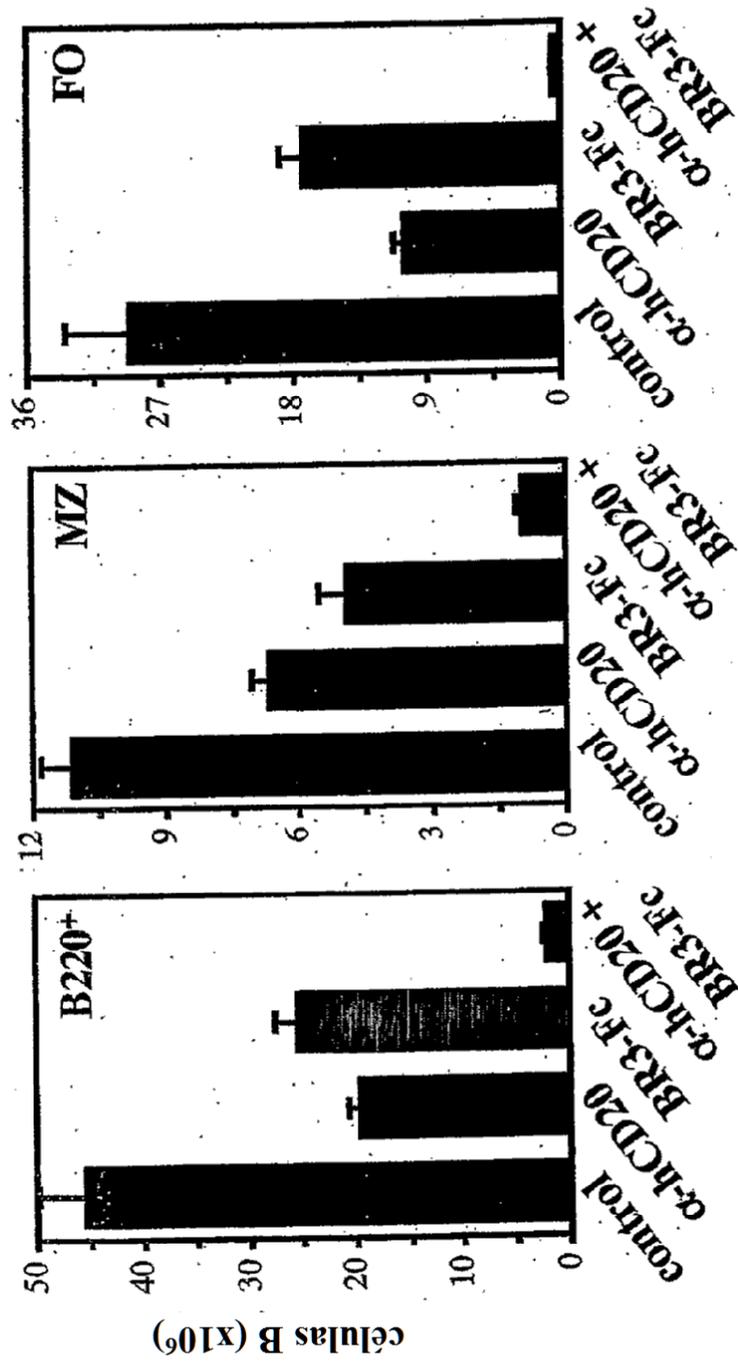


FIG. 31

SEC ID Nº:	SECUENCIA	NÚMERO DE CLON
(SEC ID Nº: )	E C F D L L L V R R Q W V P P C C E E R M I R G	1
(SEC ID Nº: )	E C F D L L L V R R Q W V P P C C E E R M I R G	2, 6, 11, 14, 24, 28, 34, 36, 40, 42, 46, 47
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	3
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	4
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	5
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	7, 9, 10, 20, 25, 29
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	8
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	12
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	13
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	15
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	16
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	17
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	18
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	19
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	21
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	22
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	23
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	26
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	27
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	30
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	31
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	32
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	33
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	35
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	37
(SEC ID Nº: )	E C C F D L L V V R R K I S S I A G A R R S I R S Q V Q A E R R R Q A D	38

FIG. 32A

SEC ID N°:	SECUENCIA	NÚMERO DE CLON
(SEC ID N°: )	S H Q K S L H I N D R I A H D T I H N N R R G V I T I H T I	39
(SEC ID N°: )	L E L L L L L L L I L L I L L L L I L L L L L L I I L I I L L	41
(SEC ID N°: )	L I V V L L I A L I A L R L L V A L R L L V L A L L I	43
(SEC ID N°: )	T I S S S E S A A H S S R D T I H S V A A N N R N I H G D	44
(SEC ID N°: )	C C	45
(SEC ID N°: )	P R R R R S D P P P D P P D P P D A P P P D D D P P P P P P P R	48
(SEC ID N°: )	V V	49
(SEC ID N°: )	W W	50
(SEC ID N°: )	S K G A Q G R H R V A R I R A H R L A L H A R R A R R D	52, 71
(SEC ID N°: )	R R R R R R D G A R N N R G R G N N S R R N N R R G R	53
(SEC ID N°: )	V V	54
(SEC ID N°: )	L L	55
(SEC ID N°: )	L L L L L L L I R P P S L P P L P P R V S P I R R L I P	56
(SEC ID N°: )	D D	57
(SEC ID N°: )	F F	58
(SEC ID N°: )	C C	59
(SEC ID N°: )	E E	60
(SEC ID N°: )		61
(SEC ID N°: )		62
(SEC ID N°: )		63
(SEC ID N°: )		64
(SEC ID N°: )		65
(SEC ID N°: )		66
(SEC ID N°: )		67
(SEC ID N°: )		68
(SEC ID N°: )		69
(SEC ID N°: )		70

GAGSP

FIG. 32B

SEC ID N°:	SECUENCIA	NÚMERO DE CLON
(SEC ID N°: )	R S R A D H A I R G R R D I I I I N H H R H A T D I	72
(SEC ID N°: )	L L I L L L L I L L L L L L L L L L L L L L I I I L I L	73
(SEC ID N°: )	V V L A L V L A L V V L A L A A L V A L L V H L V	74
(SEC ID N°: )	I G G I N A R G S A A G R D R G A A S D D S S G H	75
(SEC ID N°: )	C C	76
(SEC ID N°: )	P P P P P P D P D D D D P P P P P P P P P P P P	77
(SEC ID N°: )	V V	78
(SEC ID N°: )	W W	79
(SEC ID N°: )	V A R I A G A D R R A A H H A R N A R R D S A I A	80
(SEC ID N°: )	R R H R N N N R H N N R R R N R N L H R N R R N	81
(SEC ID N°: )	V V	82
(SEC ID N°: )	L L	83
(SEC ID N°: )	P S V H I R R L A A V G P D V I D P P A P L I S S	84
(SEC ID N°: )	D D	85
(SEC ID N°: )	F F	86
(SEC ID N°: )	C C	87
(SEC ID N°: )	E E	88
(SEC ID N°: )		89
(SEC ID N°: )		90
(SEC ID N°: )		91
(SEC ID N°: )		92
(SEC ID N°: )		93
(SEC ID N°: )		94
(SEC ID N°: )		95
(SEC ID N°: )		96

FIG. 32C