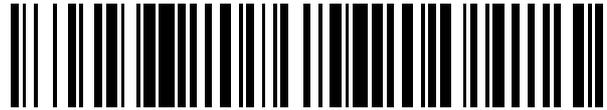


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 202**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 10167232 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2233149**

54 Título: **Combinación de activador transmembrana y modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina (TACI) y agentes anti-CD20 para tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

16.10.2007 US 980331 P

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

01.04.2016

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (50.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US y
ARES TRADING S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BROLY, HERVE;
PONCE JR., RAFAEL A.;
GRAFFNER, HANS OTTO LENNART y
PEANO, SERGIO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 565 202 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

Combinación de activador transmembrana y modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina (TACI) y agentes anti-CD20 para tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevas terapias de combinación que implican inhibición de BLYS o BLYS/APRIL usando una proteína de fusión a TACI-Fc y agente anti-CD 20 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, como se define en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la invención

Los linfocitos son una de varias poblaciones de glóbulos blancos de la sangre; estos reconocen y responden de forma específica a antígenos extraños. Las tres clases principales de linfocitos son linfocitos B (células B), linfocitos T (células T) y linfocitos citolíticos 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 salen de la médula expresando un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular: cuando un linfocito B no tratado previamente encuentra primero el antígeno para el que es específico su anticuerpo unido a membrana, la célula comienza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en linfocitos B de memoria y células efectoras llamadas células plasmáticas. Los linfocitos B de memoria tienen una vida útil más larga y siguen expresando anticuerpos unidos a membrana con la misma especificidad que la célula precursora original. Las células plasmáticas no producen anticuerpos unidos a membrana sino que producen formas secretadas del anticuerpo. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

15

20

25

Un grupo de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF) encontrados en la superficie de los linfocitos B en diversas condiciones se encuentran entre los reguladores celulares de la función de los linfocitos B en el sistema inmune. En particular, se sabe que tres receptores de TNF: activador transmembrana e interactor de CAML (TACI), activador de linfocitos B que pertenece a la familia de receptores de TNF (BAFF-R), y proteína de maduración de linfocitos B (BCMA) se unen a uno o ambos ligandos de TNF - estimulador de linfocitos B (BLYS también conocido como BAFF, TALL-1, ztnf4 y THANK) y un ligando inductor de proliferación (APRIL). De forma específica, se sabe que TACI y BCMA se unen tanto a BLYS como a APRIL y BAFF-R se une solamente a BLYS.

30

35

40

45

Se ha desarrollado una serie de antagonistas de BLYS con el fin de bloquear las diversas funciones de BLYS, que incluyen pero no se deberían limitar a coestimulación de linfocitos B, supervivencia de plasmablastos y células plasmáticas, intercambio de clase de Ig, aumento de antígenos de linfocitos B que presentan función celular, supervivencia de linfocitos B malignos, desarrollo de función celular de B-1, desarrollo de linfocitos B más allá del estadio T-1, y formación completa de centro germinal. Algunas de estas moléculas también se pueden unir y bloquear el efecto de APRIL en los linfocitos B y otros componentes del sistema inmune (Dillon *et al.* (2006) Nat. Rev. Drug Dis. 5, 235-246). Algunas moléculas que se han desarrollado para influir en la función de los linfocitos B al interferir con la unión de BLYS y/o APRIL incluyen anticuerpos BLYS tales como Lymphostat-B (Belimumab) (Baker *et al.* (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253-3265 y documento WO 02/02641); fusiones de dominio extracelular de receptor/dominio Fc tales como TACI-Ig, incluyendo una realización en particular, atacicept (Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20060034852), BAFF-R-Fc (documento WO 05/0000351), y BCMA-Ig u otras proteínas de fusión que utilizan dominios extracelulares de receptor. Una clase adicional de antagonistas de BLYS incluyen otras moléculas que dependen de la capacidad de unión de BLYS para bloquear la unión a sus receptores, tales como AMG 623, anticuerpos receptores, y otras moléculas que se desvelan en los documentos WO 03/035846 y WO 02/16312.

50

55

El antígeno CD20 (también denominado antígeno de diferenciación limitado a linfocitos B humanos, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD situada 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 de un 90 % de los linfomas no Hodgkin de linfocitos B (NHL) (Anderson *et al.* Blood 63 (6): 1424-1433 (1984)), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, prolifocitos B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder *et al.* J. Immunol. 135 (2): 973-979 (1985)). CD20 regula una etapa (s) en el proceso de activación para inicio y diferenciación del ciclo celular (Tedder *et al.*, mencionado anteriormente) y posiblemente funciona como un canal de iones de calcio (Tedder *et al.* J. Cell. Biochem. 14D: 195 (1990)).

60

65

Dada la expresión de CD20 en linfocitos B, este antígeno puede servir como un candidato para "dirección" de esas células para tratar enfermedades autoinmunitarias. En esencia, tal dirección se puede generalizar de la siguiente manera: se administran anticuerpos específicos para el antígeno de superficie CD20 de linfocitos B a un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de (aparentemente) tanto linfocitos B que producen anticuerpos normales como autoanticuerpos perjudiciales; el anticuerpo unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y agotamiento de estos linfocitos B. Independientemente del enfoque, un objetivo primordial es destruir las células que producen los autoanticuerpos; el enfoque específico se puede

determinar con el anticuerpo anti-CD20 en particular que se utiliza y, por lo tanto, los enfoques disponibles para la dirección del antígeno CD20 pueden variar de forma considerable.

El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado con ingeniería genética dirigido frente al antígeno CD20. El rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.736.137 presentado el 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*).

El RITUXAN® ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B, positivo para CD20 con bajo grado de recaída o refractario o folicular. El mecanismo *in vitro* de algunos estudios de acción han demostrado que RITUXAN® se une al complemento humano y lisa líneas de linfocitos B linfoides a través de citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) (Reff *et al.* Blood 83 (2): 435- 445 (1994)). Además, tiene actividad significativa en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Más recientemente, se ha mostrado que RITUXAN® tiene efectos antiproliferativos en ensayos de incorporación de timidina tritiada y para inducir apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos anti-CD 19 y CD20 no los presentan (Maloney *et al.* Blood 88 (10): 637a (1996)). De forma experimental también se ha observado sinergia entre RITUXAN y quimioterapias y toxinas.

En particular, el RITUXAN® sensibiliza líneas humanas de células de linfoma de linfocitos B resistentes a fármacos con respecto a los efectos citotóxicos de la doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina de difteria y ricina (Demidem *et al.*, Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12 (3): 177-186 (1997)). Algunos estudios preclínicos *in vivo* han mostrado que RITUXAN® suprime linfocitos B de la sangre periférica, ganglios linfáticos, y médula ósea de monos cinomolgos, supuestamente a través de procesos mediados por complementos y células (Reff *et al.* Blood 83 (2): 435-445 (1994)).

Algunas patentes y publicaciones de patente que se refieren a anticuerpos CD20 incluyen las Patentes de Estados Unidos N.º 5.776.456; 5.736.137; 6.399.061; y 5.843.439, así como las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 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.º 6.455.043B1 y documento WO00/09160 (Grillo- Lopez, A.); documento WO00/27428 (Grillo-Lopez y White); documento WO00/27433 (Grillo-Lopez y Leonard); documento WO00/44788 (Braslawsky *et al.*); documento WO01/10462 (Rastetter, W.); documento WO01/10461 (Rastetter y White); documento WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); solicitudes de Estados Unidos n.º US2002/0006404 y WO02/04021 (Hanna y Hariharan); solicitudes de Estados Unidos n.º US2002/0012665 A1 y WO01/74388 (Hanna, N.); solicitud de Estados Unidos n.º US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); solicitud de Estados Unidos n.º 2003/0103971 A1 (Hariharan y Hanna); solicitud de Estados Unidos n.º US2002/0009444A1, y documento WO01/80884 (Grillo-Lopez, A.); documento WO01/97858 (White, C.); solicitudes de Estados Unidos n.º US2002/0128488A1 y WO02/34790 (Reff, M.); documento WO02/060955 (Braslawsky *et al.*); documento WO2/096948 (Braslawsky *et al.*); documento WO02/079255 (Reff y Davies); Patente de Estados Unidos N.º 6.171.586B1, y WO98/56418 (Lam *et al.*); documento WO98/58964 (Raju, S.); documento WO99/22764 (Raju, S.); jumento WO99/51642, Patente de Estados Unidos N.º 6.194.551B1, Patente de Estados Unidos N.º 6.242.195B1, Patente de Estados Unidos N.º 6.528.624B1 y Patente de Estados Unidos N.º 6.538.124 (Idusogie *et al.*); documento WO/42072 (Presta, L.); documento WO00/67796 (Curd *et al.*); documento WO01/03734 (Grillo-Lopez *et al.*); solicitud de Estados Unidos n.º US 2002/0004587A1 y documento WO01/77342 (Miller y Presta); solicitud de Estados Unidos n.º US2002/0197256 (Grewal, I); Solicitud de Estados Unidos N.º US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); Patentes de Estados Unidos N.º 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398, y 5.595.721, (Kaminski *et al.*); Patentes de Estados Unidos N.º 5.500.362; 5.677.180; 5.721.108; y 6.120.767 (Robinson *et al.*); Patente de Estados Unidos N.º 6.410.391B1 (Raubitschek *et al.*); Patente de Estados Unidos N.º 6.224.866B1 y documento WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); documento WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); documento WO00/67795 (Goldenberg); Solicitud de Estados Unidos N.º US 2003/01339301 A1 y documento WOOO/74718 (Goldenberg y Hansen); documento WO/76542 (Golay *et al.*); documento WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); Patente de Estados Unidos N.º 6.368.596B1 (Ghetie *et al.*); Solicitud de Estados Unidos N.º US2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); Solicitud de Estados Unidos N.º US2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann); documento WO02/102312 (Engleman, E.); Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0068664 (Albitar *et al.*); documento WO03/002607 (Leung, S.); WO049694 (Wolin *et al.*); documento WO03/061694 (Sing y Siegall), cada uno de los cuales se incorpora expresamente en el presente documento por referencia. Véase también, Patente de Estados Unidos N.º 5.849.898 y solicitud EP n.º 330.191 (Seed *et al.*); Patente de Estados Unidos N.º 4.861.579 y documento EP332.865A2 (Meyer y Weiss); documento USP 4.861.579 (Meyer *et al.*) y documento WO95/03770 (Bhat *et al.*).

Algunas publicaciones que se refieren a terapias con Rituximab incluyen: Perotta y Abuel "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab" Resumen N.º 3360 Blood 10 (1) (parte 1-2): p. 88B (1998); Stashi *et al.* "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idopathic thrombocytopenic purpura" Blood 98 (4): 952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" New Scientist (7 de abril de 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): S197 (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." Presentados en el Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 24-29 de octubre; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presentado en el Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 24-29 de octubre; New Orleans, LA 2002.

El documento WO 2006/068867 describe terapia de combinación para trastornos de linfocitos B.

El documento WO 2007/134326 describe métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias usando una molécula de fusión de TACI-Ig.

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención es un antagonista de BLYS y un agente anti-CD20 como se define en las reivindicaciones para uso para reducir los niveles de linfocitos B en un mamífero. El antagonista de BLYS es una proteína de fusión a TACI-Fc que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado con ingeniería genética dirigido frente al antígeno CD-20. "La divulgación (...) SEG ID N. 26". La divulgación también proporciona un antagonista de BLYS y un agente anti-CD20 para uso en la reducción de los niveles de linfocitos B en un mamífero, en la que el antagonista de BLYS es una proteína de fusión a Fc que comprende el dominio extracelular de TACI o un fragmento funcional del mismo, una proteína de fusión a BAFF-R-Fc que comprende el dominio extracelular de BAFF-R o un fragmento funcional del mismo, o una proteína de fusión a BCMA-Fc que comprende el dominio extracelular de BCMA o un fragmento funcional del mismo. En aspectos particulares de la divulgación, la proteína de fusión a Fc comprende las secuencias de polipéptidos de la SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 25, o SEC ID N°: 26.

En otro aspecto de la divulgación, el antagonista de BLYS es un anticuerpo BLYS, que se une preferentemente a BLYS dentro de una región que comprende los aminoácidos 162-275 de la SEC ID N°: 8, o el anticuerpo BLYS conocido como LymphoStat-B. En un aspecto adicional de la divulgación, el antagonista de BLYS es un anticuerpo TACI, que se une preferentemente a TACI dentro de una región que comprende 72-109 de la SEC ID N°: 2 o 82-222 de la SEC ID N°: 2.

En la presente invención, algunos de los agentes anti-CD20 contemplados incluyen RITUXAN®, aunque sería adecuado cualquier anticuerpo que se dirija al antígeno CD-20, tal como se define en las reivindicaciones. El nivel de linfocitos B que se reduce con la presente invención puede ser al menos uno de medidas de recuentos de linfocitos B completos (tal como recuentos de linfocitos B en circulación), recuentos de linfocitos B de memoria, y recuentos de linfocitos B de bazo (tal como recuentos de linfocitos B de centro germinal).

La presente invención también incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD-20 y de un antagonista de BLYS tal como se define en las reivindicaciones, para uso para aliviar un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B en un paciente. En una realización, el trastorno autoinmunitario se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus (LN), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörgen y glomerulonefritis. Una enfermedad tratada de forma específica de esta manera es el lupus eritematoso sistémico (LES).

En particular, cuando el trastorno autoinmunitario es artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, o nefritis por lupus, en una realización, el antagonista de BLYS y el agente anti-CD-20 se pueden administrar adicionalmente en conjunto con terapia usando un fármaco inmunosupresor tal como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides, prednisona, y fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedades (DMARD).

Además, la presente combinación puede utilizar fármacos inmunosupresores que se ha mostrado que son eficaces en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Entre los fármacos inmunosupresores contemplados para uso en la presente invención están ciclofosfamida (CYC), azatioprina (AZA), ciclosporina A (CSA), y micofenolato mofetilo (MMF).

En el tratamiento o alivio de un trastorno en el que el agente anti-CD 20 y el antagonista de BLYS se administran a un paciente, el agente anti-CD 20 y el antagonista de BLYS se pueden administrar de forma simultánea o secuencialmente. En una realización específica, el agente anti-CD 20 se administra antes del antagonista de BLYS

En el presente documento también se desvela una composición que comprende un agente anti-CD 20 y un antagonista de BLyS.

5 Además, la invención proporciona un artículo de preparación que comprende un agente anti-CD 20 como se define en las reivindicaciones, un antagonista de BLyS como se define en las reivindicaciones, y una etiqueta en la que la etiqueta indica que la composición es para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B.

10 En todas las realizaciones de la invención, el agente anti-CD20 es un anticuerpo quimérico como se define en las reivindicaciones. En aspectos de la divulgación, el antagonista de BLyS o el agente anti-CD20, si fuera un anticuerpo, incluye anticuerpos quiméricos y humanizados.

15 En todas las realizaciones de la invención, el antagonista de BLyS es como se define en las reivindicaciones. En aspectos de la divulgación, el antagonista de BLyS es una proteína de fusión entre el dominio extracelular de un receptor que se une a BLyS y el dominio de Fc de una inmunoglobulina, o una proteína de fusión a Fc. En un aspecto específico, la proteína de fusión a Fc se selecciona entre el grupo que consiste en proteína de fusión a TACI Fc que comprende el dominio extracelular de TACI, en particular ataccept. La divulgación incluye una proteína de fusión a BAFF-R Fc que comprende el dominio extracelular de BAFF-R, en particular BR3-Ig, y proteína de fusión a BCMA que comprende el dominio extracelular de BCMA. En otros aspectos de la divulgación, el antagonista de BLyS es un anticuerpo BLyS, en particular, un anticuerpo BLyS que se une a BLyS dentro de una región de BLyS que comprende los restos 162-275, en particular Lymphostat B. En otro aspecto de la divulgación, el antagonista de BLyS es un anticuerpo BAFF-R que incluye uno que se une en una región que comprende los restos 23-38 de BAFF-R humano. En otro aspecto de la divulgación, el antagonista de BLyS es un anticuerpo TACI, un anticuerpo BCMA, o un anticuerpo que se une a ambas moléculas como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003-0012783.

25

Breve descripción de las figuras

30 La FIGURA 1 ilustra resultados de FACS a modo de ejemplo que utilizan la estrategia de selección del Ejemplo 3 seguido del análisis de las poblaciones celulares, en particular, niveles de linfocitos B en bazo de mono cinomolgo. Este ejemplo en particular es un control, por ejemplo, bazo tratado con vehículo para RITUXAN®. Este ejemplo muestra linfocitos de bazo totales (FIGURA 1A), linfocitos B CD40+/CD3- (FIGURA 1B), y linfocitos B de Memoria CD40+/CD3-/CD21+/CD27+ (FIGURA 1C). Los resultados informados en el Ejemplo 4 son valores medios de análisis de FACS realizados de la misma manera que en el ejemplo que se muestra aquí.

35 La FIGURA 2 presenta en gráfico el recuento absoluto de linfocitos B totales (CD45+/B220+) en ratones hacia el día 80 del estudio para los experimentos de combinación que se describen en el Ejemplo 5.

La FIGURA 3 presenta en gráfico el recuento absoluto de linfocitos CD20+ B humanos (B220+/huCD20+) en ratones transgénicos CD20 humanos hacia el día 80 del estudio para los experimentos de combinación que se describen en el Ejemplo 5.

40 La FIGURA 4 ilustra un resultado de FACS a modo de ejemplo que utiliza la estrategia de selección del Ejemplo 5 para el análisis de las poblaciones celulares, en particular, niveles de linfocitos B en sangre periférica de ratón. Este ejemplo en particular es un control, por ejemplo, un ratón transgénico CD20 humano con vehículo. En este ejemplo, la Figura 4A muestra glóbulos blancos totales de selección para linfocitos CD45+, a continuación en la Figura 4B, linfocitos B CD45+/B220+ de selección de la población de linfocitos CD45+. La Figura 4C muestra selección para linfocitos de sangre periférica, la Figura 4D presenta en gráfico la selección de células B220+ y CD3+ de la población de linfocitos, y la Figura 4E muestra que la mayoría de la población de linfocitos B220+ es huCD20+.

Descripción detallada

50 Aunque el tratamiento con agente anti-CD 20 parece útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, a partir de los experimentos que se describen en el presente documento se descubrió que la administración de una combinación de un agente anti-CD 20 con un antagonista de BLyS es un método de tratamiento que bloqueará rutas de señales múltiples en linfocitos B que se cree que son responsables de la producción de anticuerpos dirigidos a autoantígenos, desencadenando y/o perpetuando de este modo la afección autoinmunitaria. Esto da como resultado una reducción de los números de linfocitos B, secuencialmente, una reducción de la inmunoglobulina en circulación en un mamífero que se está sometiendo a tal tratamiento. Sin quedar ligado por la teoría, como se cree que tal inmunoglobulina en circulación es responsable, al menos parcialmente, de la estimulación de síntomas negativos de la enfermedad autoinmunitaria, la combinación de agentes anti-CD 20 y terapias dirigidos frente a la ruta de BLyS proporciona por lo tanto un nuevo método de tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos B tales como enfermedades autoinmunitarias basadas en linfocitos B. La terapia de combinación de agentes anti-CD 20 con un antagonista de BLyS puede ofrecer alternativas más eficaces a los tratamientos existentes para ciertas enfermedades, por ejemplo, LES.

65 En el presente documento, una "enfermedad autoinmunitaria" es cualquier enfermedad o trastorno no malignos que surgen de anticuerpos que se producen dirigidos frente a los propios (auto) antígenos y/o tejidos de un individuo.

Como se usa en el presente documento, "supresión de linfocitos B" se refiere a una reducción de los niveles de linfocitos B en un animal o ser humano después de tratamiento con fármaco o anticuerpo, en comparación con el nivel antes del tratamiento. Los niveles de linfocitos B se pueden medir usando ensayos bien conocidos tales como obtención de un recuento de sangre completa, mediante análisis de FACS tiñendo marcadores de linfocitos B conocidos, y con métodos tales como los que se describen en los Ejemplos Experimentales. La supresión de linfocitos B puede ser parcial o completa. En un paciente que recibe un fármaco para supresión de linfocitos B, los linfocitos B se suprimen generalmente durante el periodo de tiempo en el que el fármaco está en circulación en el organismo del paciente y el tiempo para la recuperación de linfocitos B.

La expresión "agente anti-CD 20" incluye cualquier molécula que se une a CD-20 y en la realización más preferente se dirige a la célula asociada a la proteína CD-20 para eliminación. Tales moléculas incluyen anticuerpos anti-CD-20, tales como RITUXAN® y versiones relacionadas de ese agente tales como ocrelizumab, una versión humanizada de ese anticuerpo, ofatumumab (HuMax-CD20®, un agente anti-CD 20 totalmente humano), DXL625 (un agente anti-CD20 monoclonal de segunda generación), GA101 (un agente anti-CD20 de tercera generación que tiene una región Fc alterada), las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 20060121032, las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 200700202059, las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 20070014720, las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 20060251652, las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 20050069545, las moléculas anti-CD20 que se describen en la Solicitud de Estados Unidos N.º 20040167319, TRU-015 (una molécula inmunofarmacéutica de molécula pequeña que se dirige a CD 20), así como moléculas conjugadas tales como ibritumomab (ZEVALIN®).

Los "fármacos inmunosupresores" son cualquier molécula que interfiere con el sistema inmune y mitiga su respuesta a antígenos extraños o autoantígenos. La ciclofosfamida (CYC) y el micofenolato mofetilo (MMF) son dos de tales tipos de moléculas. Esta expresión pretende incluir cualquier fármaco o molécula útil como un agente terapéutico en la regulación negativa del sistema inmune. Este método contempla en particular algunos fármacos que se han usado para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus (LN), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynauld, síndrome de Sjorgen y glomerulonefritis.

Los términos "BLYS" o "polipéptido BLYS", "TALL-1" o "polipéptido TALL-1", o "BAFF" o "polipéptido BAFF", cuando se usan en el presente documento incluyen "polipéptidos BLYS de secuencia nativa" y "variantes de BLYS". "BLYS" es una denominación dada a los polipéptidos que están codificados con la secuencia de BLYS Humana (SEC ID N.º: 7) o la secuencia de BLYS de Ratón (SEC ID N.º: 9). Dentro de esta denominación también se incluyen los polipéptidos que muestran actividad biológica de BLYS. Por ejemplo, un BLYS biológicamente activo potencia uno cualquiera o una combinación de los siguientes sucesos *in vitro* o *in vivo*: un aumento de la supervivencia de linfocitos B, un aumento del nivel de IgG y/o IgM, un aumento de los números de células plasmáticas, y procesamiento de NF- Kb2/100 a p52NF-Kb en linfocitos B esplénicos (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). Un experto habitual en la materia conoce bien varios ensayos útiles para someter a ensayo algunos antagonistas de BLYS tales como el ensayo de proliferación de linfocitos B que se describe en el documento WO 00/40716, entre otros.

En resumen, los linfocitos B humanos se aíslan de células mononucleares de sangre periférica usando perlas magnéticas de CD19 y el sistema de separación magnética VarioMacs (Miltenyi Biotec Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos B purificados se mezclan con BLYS soluble (25 ng/ml) e IL-4 humana recombinante (10 ng/ml Pharmingen), y las células se siembran en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 1×10^5 células por pocillo. El antagonista de BLYS a someter a ensayo se puede diluir de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 6 ng/ml, se puede incubar con los linfocitos B durante cinco días, pulsando durante una noche en el día cuatro con 1 µCi de ³H-timidina por pocillo. Como un control, también se puede incubar antagonista de BLYS con linfocitos B e IL-4 sin BLYS. Las placas se cosechan usando un cosechador de placas Packard, y se hace recuento usando el lector Packard.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir con medios recombinantes y/o de síntesis. La expresión "secuencia nativa" incluye específicamente formas truncadas, solubles o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variante de origen natural (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas del polipéptido de origen natural.

En general, los polipéptidos "variables" para cualquiera de los polipéptidos se desvelan en la presente memoria descriptiva incluyen polipéptidos 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 aminorar de longitud completa o "secuencia nativa". Cuando se analizan los dominios extracelulares de receptores, también se contemplan fragmentos que se unen a polipéptidos de BlyS de secuencia nativa. Por el contrario, cuando se analizan fragmentos

de BLYS, se contemplan fragmentos que se unen a uno cualquiera o más de los tres receptores de BLYS. Habitualmente, un polipéptido variable tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 81 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos

5 aproximadamente un 82 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 83 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 84 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos

10 aproximadamente un 86 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 87 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 88 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 89 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos

15 aproximadamente un 91 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 92 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 93 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 94 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 95 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos

20 aproximadamente un 96 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 97 %, más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 98 % y aún más preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 99 % con el polipéptido o un fragmento especificado del mismo. Generalmente, los polipéptidos variables no incluyen la secuencia de polipéptidos nativa. Habitualmente, los polipéptidos variables tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 aminoácidos, a menudo una longitud de al menos

25 aproximadamente 20 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 30 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 40 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 60 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 70 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 80 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 90 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 100 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 150 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 200 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 250 aminoácidos, más a menudo una longitud de al menos aproximadamente 300 aminoácidos, o más.

35 Como se ha mencionado anteriormente, un antagonista de BLYS puede funcionar de una manera directa o indirecta para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la señalización de BLYS, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el antagonista de BLYS se puede unir directamente a BLYS. Por ejemplo, una aglutinante directo es un polipéptido que comprende el dominio extracelular (ECD) de un receptor de BLYS tal como TACI, BAFF-R, y BCMA.

40 Los receptores de BLYS se pueden describir como sigue a continuación. Los polipéptidos de TACI de la invención incluyen polipéptidos de TACI que comprenden o que consisten en los aminoácidos 1-246 de la SEC ID N°: 2. El término general "TACI" incluye los polipéptidos de TACI que se describen en los documentos WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979, WO 01/81417, y WO 02/094852. Los polipéptidos de TACI se pueden aislar a partir de diversas fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparar con métodos

45 recombinantes y/o de síntesis. Los polipéptidos BAFF-R incluyen el polipéptido BAFF-R que comprende o que consiste en la secuencia contigua de los restos de los aminoácidos 1 a 184 de la SEC ID N°: 4. El término general "BAFF-R" incluye los polipéptidos de BAFF-R que se describen en el documento WO 02/24909 y en el documento WO 03/14294. Los polipéptidos de BAFF-R se pueden aislar a partir de diversas fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparar con técnicas recombinantes y/o de síntesis. Los polipéptidos de BCMA

50 incluyen polipéptidos de BCMA que comprenden o que consisten restos de los aminoácidos 1-184 de la SEC ID N°: 6. El término general "BCMA" incluye los polipéptidos de BCMA que se describen 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); y Madry *et al.*, Int. Immunology, 10: 1693-1702 (1998). Los polipéptidos de BCMA se pueden aislar de diversas fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o preparar con métodos recombinantes y/o

55 de síntesis.

Para los fines de funcionamiento como un antagonista de BLYS, el ECD de estos receptores es un polipéptido básicamente libre de los dominios transmembrana o citoplasmático que generalmente retiene la capacidad de unirse a BLYS. De forma específica, el dominio extracelular de TACI puede comprender los aminoácidos 1 a 154 de la

60 secuencia de polipéptidos de TACI (SEC ID N°: 2). Además, el ECD puede ser fragmentos o variantes de esta secuencia, tal como formas de ECD de TACI como se describe en von Bulow *et al.*, mencionado anteriormente, documentos WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979, y WO 01/81417. En particular, estas formas de ECD pueden comprender los aminoácidos 1-106 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-142 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 30-154 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 30-106 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 30-110 de la

65 SEC ID N°: 2, aminoácidos 30-119 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-166 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-165 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-114 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-119 de la SEC ID N°: 2, aminoácidos 1-120

de la SEC ID N°: 2, y los aminoácidos 1-126 de la SEC ID N°: 2. Además, el ECD de TACI puede comprender las moléculas que tienen solamente un dominio rico en cisteína.

5 Algunas formas de ECD de BAFF-R incluyen las que comprenden los aminoácidos 1-71 de la secuencia de polipéptidos de BAFF-R (SEC ID N°: 4). Además, el ECD puede ser fragmentos o variantes de esta secuencia tales como formas de ECD de BAFF-R como se describe en los documentos WO 02/24909, WO 03/14294, y WO 02/38766. En particular, estas formas de ECD pueden comprender los aminoácidos 1-77 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 7-77 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 1-69 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 7-69 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 2-62 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 2-71 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 1-61 de la SEC ID N°: 4
10 and aminoácidos 2-63 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 1-45 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 1-39 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 7-39 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 1-17 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 39-64 de la SEC ID N°: 4, aminoácidos 19-35 de la SEC ID N°: 4, y los aminoácidos 17-42 de la SEC ID N°: 4. Además, el ECD de BAFF-R puede comprender las moléculas que tienen un dominio rico en cisteína.

15 Algunas formas de ECD de BCMA incluyen las que comprenden los aminoácidos 1-48 de la secuencia de polipéptidos de BCMA (SEC ID N°: 6). Además, el de ECD puede ser fragmentos o variantes de esta secuencia tales como formas de ECD de BCMA como se describe en los documentos WO 00/40716 y WO 05/075511. En particular, estas formas de ECD pueden comprender los aminoácidos 1-150 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 1-48 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 1-41 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 8-41 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 8-37 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 8-88 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 41-88 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 1-54 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 4-55 de la SEC ID N°: 6, aminoácidos 4-51 de la SEC ID N°: 6, y los aminoácidos 21-53 de la SEC ID N°: 6. Además, el ECD de BCMA puede comprender las moléculas que tienen solamente en un dominio parcial rico en cisteína.

25 En una realización más, la región de unión a BlyS de un receptor de BlyS (por ejemplo, un dominio extracelular o fragmento del mismo de BAFF-R, BCMA o TACI) se puede fusionar con una porción de Fc de una molécula de inmunoglobulina para facilitar su solubilidad *in vivo*. De acuerdo con una realización, el antagonista de BlyS se une a un polipéptido BlyS con una afinidad de unión de 100 nM o inferior. De acuerdo con otra realización, el antagonista de BlyS se une a un polipéptido BlyS con una afinidad de unión de 10 nM o inferior. De acuerdo con
30 otra realización más, el antagonista de BlyS se une a un polipéptido BlyS con una afinidad de unión de 1 nM o inferior.

En otro ejemplo, algunos antagonistas de BlyS incluyen polipéptidos de unión a BlyS que no son secuencias nativas o variantes de las mismas. Algunos ejemplos de tales polipéptidos son los que tienen la secuencia de
35 Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III como se describe en el documento WO 05/000351. En particular, algunos polipéptidos de unión incluyen ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N°: 13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N°: 14), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEC ID N°: 15), ECFDLLVRSWVPCMLR (SEC ID N°: 16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N°: 17), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 del documento WO 05/000351.

40 Como alternativa, el antagonista de BlyS se puede unir a un dominio extracelular de secuencia nativa de TACI, BAFF-R, o BCMA en su región de unión a BlyS para bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la unión a BlyS *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. Por ejemplo, tal antagonista indirecto es un anticuerpo TACI que se une en una región de TACI de modo que la unión de BlyS está impedida estéricamente. Por ejemplo, se cree que la unión a los aminoácidos 72-109 o una región vecina bloquea la unión a BlyS. También podría ser ventajoso bloquear la unión
45 de APRIL a esta molécula, que se cree que se produce en la región de los aminoácidos 82-222. Otro antagonista de BlyS es un anticuerpo BAFF-R que se une en una región de BAFF-R de modo que la unión de BAFF-R humano a BlyS está impedida estéricamente. Por ejemplo, se cree que la unión en los aminoácidos 23-38 o en los aminoácidos 17-42 o una región vecina bloquea la unión a BlyS. Por último, un antagonista indirecto adicional sería un anticuerpo BCMA que se une a una región de BCMA de modo que la unión de BlyS está impedida estéricamente. Por ejemplo, se cree que la unión en los aminoácidos 5-43 o una región vecina bloquea la unión a
50 BlyS (o APRIL).

En algunos aspectos de esta divulgación, un antagonista de BlyS incluye anticuerpos BlyS. Cuando se hace referencia al término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre de forma específica, por ejemplo,
55 anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos de una sola cadena y fragmentos de anticuerpos. De acuerdo con algunos aspectos, un polipéptido desvelado en el presente documento se fusiona en un armazón de anticuerpo, por ejemplo, en la región variable o en una CDR de modo que el anticuerpo se puede unir e inhibir la unión de BlyS a TACI, BAFF-R, o BCMA o inhibe la señalización de BlyS. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido de esta divulgación pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido de esta divulgación pueden ser un fragmento de anticuerpo. Como alternativa, un anticuerpo desvelado en el presente documento se puede producir mediante inmunización de un animal con un polipéptido de esta divulgación. Por lo tanto, se contempla un anticuerpo dirigido frente a un polipéptido de esta divulgación.

65 En particular, se contemplan anticuerpos específicos para BlyS que se unen dentro de una región de BlyS humano (SEC ID N°: 8) que comprenden los restos 162-275 y/o un aminoácido vecinal de aminoácidos seleccionados entre

el grupo que consiste en 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 y 265 de BLYS humano. La unión de los anticuerpos es tal que el anticuerpo impide de forma estérica la unión de BLYS a uno o más de sus receptores. Tales anticuerpos se describen en los documentos WO 02/02641 y WO 03/055979. Un anticuerpo particularmente precedente es el que se describe como Lymphostat-B (Baker *et al.* (2003) *Arthritis Rheum*, 48, 3253-3265).

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos frente a un sitio antigénico individual. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan con el cultivo de hibridoma, sin contaminar con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población básicamente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo con cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales desvelados en el presente documento se pueden preparar con el método de hibridoma que se describió primero en Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar con métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas que se describen en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

En el presente documento los anticuerpos monoclonales incluyen de forma específica anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena (s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos quiméricos.

Algunas formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana.

En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que algunos restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen con restos de una CDR de una especie humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen con los correspondientes restos humanos. Además, algunos anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR ni marco conservadas importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todos o básicamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina humana y todas o básicamente 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. Por lo general el número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR no es superior a 6 en la cadena H, y en la cadena L, no es superior a 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, 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 PRIMATIZADO en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, mediante inmunización de monos macaco con el antígeno de interés. En la técnica se conocen algunos métodos para preparar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, 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).

"Fragmentos funcionales" de anticuerpos de unión son dos fragmentos que retienen la unión con respecto a BLYS, TACI, BAFF-R, o BCMA con básicamente la misma afinidad que la molécula de cadena completa intacta a partir de

la que se derivan y pueden ser capaces de suprimir linfocitos B tal como se mide con ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como los que se describen en el presente documento.

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

"Citotoxicidad mediada por célula 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, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células receptoras citotóxicas se unan de forma específica a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente eliminen la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "abrazan" las células citotóxicas y se requieren absolutamente para tal eliminación. Las células primarias para mediar ADCC, linfocitos 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, *Ann. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.500.362 o 5.821.337. Algunas células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

"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 de complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar 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 entorno natural. Algunos componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con el uso de diagnóstico o terapéutico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo tal como se determina con el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencias de aminoácido N-terminal o interno mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad con SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata.

El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. De forma habitual, sin embargo, el anticuerpo aislado se prepara con al menos una etapa de purificación.

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New 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 se pueden dividir en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (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 la cadena: Gly, Pro; (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

El término sustitución de aminoácido "conservativa" pretende hacer referencia a sustituciones de aminoácidos que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Los cambios de aminoácidos conservativos dan como resultado 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 de un grupo se pueden considerar conservativas con respecto a estructura y función. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que el papel de un resto en particular se determina por su contexto dentro de la estructura tridimensional de la molécula en la que se produce. Por ejemplo, algunos restos de Cys se pueden producir en la forma oxidada (disulfuro), que es menos polar que la forma reducida (tiol). La parte alifática larga de la cadena lateral de Arg puede constituir una característica crítica de su papel estructural o funcional, y esto se cree conservar de la mejor manera mediante sustitución de un resto no polar, en lugar de otro resto básico. Además, se reconoce que algunas cadenas laterales que contienen grupos aromáticos (Trp, Tyr, y Phe) pueden participar en interacciones iónica-aromática o "catión-π". En estos casos, la sustitución de una de estas cadenas laterales con un miembro del grupo polar ácido o sin carga puede ser conservativa con respecto a estructura y función. Algunos restos tales como Pro, Gly, y Cys

(forma disulfuro) pueden tener efectos directos en la conformación de la cadena principal, y a menudo pueden no sustituirse sin distorsiones estructurales.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptidos 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 tal secuencia de ligando o receptor identificada en el presente documento, después de alineamiento de las secuencias e introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento para fines de determinación de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software informático disponible al público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir un alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para fines en el presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación 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 que sigue a continuación. El programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla que sigue a continuación se ha presentado con documentación de usuario en la U. S. Copyright Office, Washington D. C., 20559, en la que está registrado con el N.º de Registro U. S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede recopilar a partir del código fuente proporcionado en la tabla que sigue a continuación. El programa ALIGN-2 se debería recopilar para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan con el programa ALIGN-2 y no varían.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones en una proteína que son posiciones preferentes para mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Un resto o grupo de restos diana se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen con un aminoácido con carga neutra o negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con una diana de unión. Esas posiciones en los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional con respecto a las sustituciones a continuación se refinan mediante introducción adicional o de otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis mediante ala o aleatoria se realiza en el codón o región diana y las variantes expresadas se identifican sistemáticamente para la actividad deseada.

La expresión "ángulo diedro" se refiere a una rotación con respecto a un enlace. Véase por ejemplo, Creighton, T. E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2 ed., W. H. Freeman y Company, New York, NY. El término, "phi" es un ángulo diedro que representa una rotación con respecto al enlace N-C de un aminoácido. Véase por ejemplo, Creighton, T. E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2 ed., W. H. Freeman y Company, New York, NY. Algunos 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 refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalente mente entre sí, en el que cada una de las 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 también puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como unión a una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes se pueden unir directamente con un solo enlace peptídico o a través de un conector peptídico que contiene uno o más restos de aminoácidos. Por lo general, las dos partes y el conector están en marco de lectura entre sí.

Un "conjugado" se refiere a cualquier molécula híbrida, incluyendo proteínas de fusión así como moléculas que contienen tanto partes de aminoácido o de proteína como partes no proteicas. Algunos conjugados se pueden sintetizar con diversas técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase de solución, técnicas de síntesis de química orgánica o una combinación de estas técnicas. La elección de la síntesis dependerá de la molécula en particular a generar. Por ejemplo, una molécula híbrida de naturaleza no totalmente de "proteína" se puede sintetizar mediante una combinación de técnicas recombinantes y técnicas en fase de solución.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión de Fc" se refiera moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las proteínas de fusión de Fc comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del reconocimiento del antígeno y sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La molécula de proteína de fusión de Fc por lo general incluye 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 proteína de fusión de Fc se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Por ejemplo, algunas proteínas de fusión de Fc útiles de acuerdo con esta divulgación son 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
 5 realización de la divulgación, el dominio extracelular de BAFF-R, TACI o BCMA está condensado con un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

El término "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos,
 10 vacas, etc. Preferentemente, en el presente documento el mamífero es el 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 cancerígenas; reducir el tamaño del tumor;
 15 inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados al cáncer. A continuación, véase la definición de "tratado". Hasta el punto en el que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o la eliminación de células cancerígenas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico.

Los anticuerpos BLYS o receptores de BLYS desvelados en el presente documento se pueden producir mediante transfección transitoria o estable de células hospedadoras eucariotas tales como células CHO.

"Vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se está exponiendo a los mismos a las dosificaciones y concentraciones usadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Algunos ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o
 30 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 de quelación tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN polietilenglicol (PEG), PLURONICS™.

Polinucleótidos, Vectores, Células Hospedadoras

De acuerdo con un número de aspectos desvelados en el presente documento, el antagonista de BLYS puede comprender polipéptidos específicos que se producen usando polinucleótidos específicos en vectores específicos y usando células hospedadoras específicas. Los diversos tipos de polipéptidos de la presente invención se pueden describir ampliamente y se seleccionan entre el grupo que consiste en secuencias basadas en receptor, secuencias basadas en anticuerpo, y secuencias de unión artificial (es decir, no nativas). Algunos ejemplos de las secuencias basadas en receptor son las secuencias que se unen a BLYS que se aislaron o se derivaron de dominios de los receptores que se unen a BLYS *in vivo*, tales como TACI, BAFF-R, o BCMA. Las secuencias basadas en anticuerpo son las que se producen usando tecnología del desarrollo de anticuerpo y mantienen la estructura general de una molécula de anticuerpo. Algunos ejemplos de secuencias basadas en anticuerpo son LymphoStat-B, o anticuerpos para receptores de BLYS. Algunos ejemplos de las secuencias de unión artificial incluyen los péptidos 17mer descritos en el presente documento, polipéptidos que incorporan uno o más péptidos 17mer como regiones núcleo, y formas modificadas de forma covalente de los péptidos y polipéptidos 17mer (por ejemplo, proteínas de fusión de Fc, polipéptidos etiquetados, polipéptidos protegidos, polipéptidos conjugados, proteínas de fusión, etc.). En el presente documento se describen diversas técnicas que se usan para preparar estas formas de polipéptidos. En la técnica se conocen algunos métodos para etiquetado de polipéptidos y conjugación de moléculas a polipéptidos.

Las composiciones que se desvelan en el presente documento se pueden preparar usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica.

La descripción que sigue a continuación se refiere a métodos para producir tales polipéptidos específicos mediante cultivo de células hospedadoras transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico de codificación y recuperación del polipéptido del cultivo celular. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New 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 se puede insertar en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o a la expresión. Diversos vectores están disponibles al público. Los componentes del vector por lo general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador,

un promotor, y una secuencia determinación de la transcripción, cada uno de los cuales se describe a continuación. En la técnica se conocen algunas secuencias señal opcionales, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias terminadas de la transcripción que se pueden usar y se describen con más detalle en el documento WO 97/25428.

5 Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que el organismo hospedador reconoce y se une de forma operativa a la secuencia de ácidos nucleicos de codificación. Los promotores son secuencias sin traducir ubicadas cadena arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (por lo general dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácidos
10 nucleicos en particular, a la que se unen de forma operativa. Por lo general, tales promotores entran en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician el aumento de los niveles de transcripción del ADN bajo su control como 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, un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales se conoce bien. Estos promotores se unen de forma
15 operativa al ADN de codificación mediante retirada del promotor del ADN fuente mediante digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia de promotora aislada en el vector.

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

Se pueden usar vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero del ADN de codificación. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse
30 de forma eficaz en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado con el vector de expresión [Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente]. Algunos sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión y una célula hospedadora adecuados, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados con los ADN clonados, así como la identificación sistemática rápida de tales polipéptidos para
35 propiedades biológicas o fisiológicas deseadas.

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

40 En el presente documento, algunas células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas para esta finalidad incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*,
45 *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y que *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* 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.

50 Además de procariotas, algunos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores. Algunas células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptido glicosilado se derivan de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de tales células hospedadoras se describen adicionalmente en el documento WO97/25428.

55 Las células hospedadoras se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente y se cultivan en medio de nutrientes modificado según sea apropiado para inducir promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

60 Transfección se refiere a la recogida de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si cualquier secuencia de codificación se expresa de hecho como si no lo hace. El experto habitual en la materia conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce generalmente cuando cualquier indicación de la operación de este vector se produce dentro de la célula hospedadora.

65 Transformación se refiere a introducción de ADN en un organismo de modo que el ADN se puede replicar, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora

usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que usa cloruro cálcico, como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, o electroporación, por lo general se usa para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. 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 en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Además, algunas plantas se pueden transfectar usando tratamiento con ultrasonidos como se describe en el documento WO 91/00358 publicado el 10 de enero de 1991.

Para células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede usar el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Algunos aspectos generales de transformaciones de sistema hospedador de células de mamífero se han descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 4.399.216. Algunas transformaciones en levadura por lo general se realizan 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 se pueden usar otros métodos para introducir ADN en células, tal como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformación de células de mamífero, véase Keown *et al.* *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Las células procariotas se pueden cultivar en medios de cultivo apropiados como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Algunos 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 con Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de tales medios se puede complementar si fuera 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), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, o las previamente usadas con la célula hospedadora se seleccionan para expresión, y es evidente para el experto habitual en la materia.

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

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

Cuando el polipéptido se produce en una célula recombinante distinta de una de origen humano, este está libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, normalmente es necesario recuperar o purificar el polipéptido a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que sean básicamente homogéneas. Como una primera etapa, el medio de cultivo o lisado se puede centrifugar para retirar restos celulares en partículas. Los siguientes son procedimientos a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatoenfoco; 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. Presentación de Fagos.

De acuerdo con algunos aspectos, los polipéptidos de esta divulgación se seleccionan entre el grupo que consiste en: Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N.º: 13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N.º: 14), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEC ID N.º: 15), ECFDLLVRSWVPCMLR (SEC ID N.º: 16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N.º: 17), y secuencias enumeradas en la FIG. 32 del documento WO 05/000351, se pueden usar en presentación de fagos.

El uso de las técnicas de presentación de fagos permite la generación de grandes bibliotecas de variantes de proteínas que se pueden clasificar rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con afinidad elevada. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de cubierta 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 ácidos nucleicos que codifica la proteína o polipéptido se fusiona con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una porción 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 expresión de fagos monovalentes, la fusión génica se expresa a niveles bajos y algunas proteínas del gen III de tipo silvestre también se expresan de modo que se conserva la

infectividad de las partículas. En muchas patentes se han desvelado métodos para generar bibliotecas de péptidos y para identificar sistemáticamente esas bibliotecas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.723.286; Patente de Estados Unidos N.º 5.432.018; Patente de Estados Unidos N.º 5.580.717; Patente de Estados Unidos N.º 5.427.908; y Patente de Estados Unidos N.º 5.498.530).

5 En algunos aspectos, la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se expresan como bibliotecas de péptidos en fagos. El fago que expresa la biblioteca de polipéptidos de Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se somete a continuación a selección basada en unión a BLYS. En algunas realizaciones, el proceso de selección consiste en permitir que algunos fagos se unan a BLYS biotinilado que posteriormente se une a una placa neutravidina. Los fagos unidos a la placa a través de la unión a BLYS-biotina-neutravidina se recuperan y propagan. En algunas realizaciones, los fagos están sujetos a varias rondas de selección. En algunas realizaciones, el fago se incuba con BLYS-biotina, seguido por la adición de BLYS no biotinilado como un aglutinante competitivo.

15 En los Ejemplos se proporcionan directrices adicionales de uso de presentación de fagos en el contexto de la presente divulgación.

Polipéptidos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos

20 Algunas moléculas de proteína de fusión de Fc que comprenden los polipéptidos de esta divulgación se contemplan adicionalmente para uso en los métodos en el presente documento. En algunas realizaciones, la molécula comprende una fusión de un polipéptido desvelado en el presente documento con una inmunoglobulina o una región en particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la proteína de fusión de Fc, una fusión de este tipo comprende de manera útil la región Fc de una molécula de IgG. En una realización adicional, la región Fc es de una molécula de IgG1 humana. En algunas formas de realización, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1.

30 Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos N.º 5.428.130, Patente de Estados Unidos N.º 5.843.725, Patente de Estados Unidos N.º 6.018.026, y Chamow *et al.*, TIBTECH, 14: 52-60 (1996).

35 El diseño más simple y más directo de proteínas de fusión de Fc a menudo combina el dominio(s) de unión de un polipéptido antagonista de la presente invención, preferentemente una secuencia nativa, con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En otra realización, el polipéptido puede ser artificial, tal como un polipéptido que comprende una secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N.º: 13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N.º: 14), ECFDLLVRRWVPCSEMLG (SEC ID N.º: 15), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N.º: 16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N.º: 17), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 se pueden unir de forma covalente a una porción de Fc de una inmunoglobulina. Además, uno o más de estos polipéptidos se pueden unir entre sí y se pueden unir a una parte de Fc de una inmunoglobulina.

40 Normalmente, cuando se preparan las proteínas de fusión de Fc desveladas en el presente documento, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión se fusiona de forma C-terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, algunas fusiones N-terminales también son posibles.

45 Por lo general, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos dominios bisagra, CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan en el extremo C-terminal de la porción de Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal a la CHI 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; algunos sitios en particular se conocen bien y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción, o características de unión de la proteína de fusión de Fc.

50 En una realización preferente, la secuencia de dominio de unión se condensa con el extremo N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina G1 (IgG1). Es posible fusionar toda la región constante de cadena pesada a la secuencia de dominio de unión. Sin embargo, más preferentemente, en la fusión se usa una secuencia que empieza en la región bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión de papaína que define Fc de IgG químicamente (es decir, el resto 216, tomando el primer resto de la región constante de cadena pesada para que sea 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferente, la secuencia de aminoácidos del dominio de unión 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.

60 Para proteínas de fusión de Fc biespecíficas, las proteínas de fusión de Fc se ensamblan como multímeros, y en particular como heterodímeros o heterotetrámeros. Por lo general, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica 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 peso molecular más elevado; por lo general IgM existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y en ocasiones la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso

de multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

Diversas proteínas de fusión de Fc ensambladas a modo de ejemplo se presentan en diagrama esquemático a continuación: (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) ACLVHCH-(ACH, o ACL-VHCH, o VLCL-ACH); (e) VLCL-ACH- (ACL-VHCH, o VLCL ACH); y (f) (A-Y) n- (VLCL-VHCH) 2, en las que cada A representa polipéptidos idénticos o diferentes que comprenden una secuencia de aminoácidos de secuencias derivadas de dominios de receptores de BlyS, secuencias derivadas de anticuerpos para BlyS o a receptores para BlyS, o secuencias artificiales tales como Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEC ID N°: 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEC ID N°: 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEC ID N°: 7), ECFDLLVRSWVPCMLR (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 que 1; Y designa el resto de un agente de reticulación covalente.

Por cuestiones de brevedad, las estructuras mencionadas anteriormente solamente muestran características fundamentales; no indican unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando se requieren tales dominios para actividad de unión, se deberían construir para estar presentes en las ubicaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Como alternativa, las secuencias de Fc se pueden insertar entre secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y de cadena ligera, de modo que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de Fc se fusionan con el extremo en la posición 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada rama de una inmunoglobulina, ya sea entre la bisagra y el dominio CH2, o entre los dominios CH2 y CH3. En Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol., 28: 1027-1037 (1991) se han informado construcciones similares.

Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no se requiere en las proteínas de fusión de Fc de la presente divulgación, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente, ya sea asociada de forma covalente a un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina de dominio de unión, o fusionada directamente al dominio de unión. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina por lo general se coexpresa con el ADN que codifica la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina de dominio de unión. Después de la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asocian de forma covalente para proporcionar una estructura similar a la de la inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidos por disulfuro. Algunos métodos adecuados para la preparación de tales estructuras se desvelan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567, presentada el 28 de marzo de 1989.

Algunas proteínas de fusión de Fc son construyen de la forma más conveniente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción de dominio de unión en marco a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también se puede usar fusión a fragmentos de inmunoglobulina genómicos (véase, por ejemplo, Aruffo *et al.*, Cell, 61: 1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.*, Cell, 66: 1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para expresión. Los ADNc que codifican las regiones constantes de cadena pesada de IgG se pueden aislar basándose en secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas linfocitos de bazo o de sangre periférica, mediante hibridación o mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican el dominio de unión y las partes de inmunoglobulina de la proteína de fusión de Fc se insertan en tándem en un vector plásmido que dirige la expresión eficaz en las células hospedadoras elegidas.

Se han realizado modificaciones en particular para producir secuencias de Fc útiles para crear moléculas de fusión, tales como las moléculas de fusión de Fc de antagonista de BlyS para uso en la presente invención. De forma específica, se generaron seis versiones de un Fc de IgG1 humana modificada para la creación de proteínas de fusión Fc y se denominan Fc-488, así como Fc4, Fc5, Fc6, Fc7, y Fc8. Fc-488 (SEC ID N°: 39) se diseñó para clonación conveniente de una proteína de fusión que contiene la región Fc de γ 1 humana, y se construyó usando la región constante de γ 1 de inmunoglobulina humana de tipo silvestre como un molde. La preocupación por los posibles efectos perjudiciales debidos a un resto de cisteína sin emparejar llegó a la decisión de sustituir la cisteína que normalmente se une mediante enlaces disulfuro con la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina con un resto de serina. Un cambio adicional se introdujo en el codón que codifica la posición de índice 218 de la UE para introducir un sitio de reconocimiento de enzima de restricción BglII para facilitar las futuras manipulaciones de ADN. Estos cambios se introdujeron en el producto de PCR codificado en los cebadores de PCR. Debido a la localización del sitio de BglII y con el fin de completar la región bisagra de Fc, se incorporaron codones para las posiciones 216 y 217 del índice de la UE en las secuencias de parejas de proteínas de fusión.

Fc4, Fc5, y Fc6 contienen mutaciones para reducir las funciones efectoras mediadas por el Fc mediante la reducción

de la unión de Fc γ RI y la unión de Clq de complemento. Fc4 contiene las mismas sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en Fc-488. Se introdujeron sustituciones de aminoácidos adicionales para reducir las posibles funciones efectoras mediadas por Fc. De forma específica, se introdujeron tres sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a Fc γ RI. Estas son las sustituciones en las posiciones 234, 235 y 237 del índice de la UE. Se ha
5 mostrado algunas sustituciones en estas posiciones reducen la unión a Fc γ RI (Duncan *et al.*, Nature 332: 563 (1988)). Estas sustituciones de aminoácidos también pueden reducir la unión a Fc γ RIIa, así como la unión a Fc γ RIII (Sondermann *et al.*, Nature 406: 267 (2000); Wines *et al.*, J. Immunol. 164: 5313 (2000)).

Varios grupos han descrito la importancia de las posiciones 330 y 331 del índice de la UE (restos de aminoácidos 134 y 135 de la SEC ID N^o: 6) en la unión a Clq de complemento y posterior fijación del complemento (Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173: 1483 (1991); Tao *et al.*, J. Exp. Med. 178: 661 (1993)). Las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones se introdujeron en Fc4 para reducir la fijación de complemento. El dominio C_{H3} de Fc4 es idéntico al encontrado en el polipéptido de tipo silvestre correspondiente, excepto por el codón de parada, que se
10 cambió de TGA a TAA para eliminar un sitio potencial de metilación dam cuando el ADN clonado se cultiva en dam más cepas de *E. coli*.

En Fc5, el resto de arginina en la posición 218 del índice de la UE se volvió a mostrar con respecto a una lisina, debido a que el esquema de clonación de BgIII no se usó en las proteínas de fusión que contenían este Fc en particular. El resto de la secuencia de Fc5 coincide con la descripción anterior para Fc4.
20

Fc6 es idéntico a Fc5 excepto en que el codón de la lisina terminal carboxilo se ha eliminado. La lisina C-terminal de las inmunoglobulinas maduras a menudo se elimina de las inmunoglobulinas maduras después de la traducción antes de la secreción de linfocitos B, o se elimina durante la circulación en suero. En consecuencia, el residuo de lisina C-terminal por lo general no se encuentra en los anticuerpos circulantes. Como en Fc4 y Fc5 mencionados
25 anteriormente, el codón de parada en la secuencia de Fc6 se cambió por TAA.

Fc7 es idéntico al γ I Fc de tipo silvestre a excepción de una sustitución de aminoácido en la posición 297 del índice de la UE situado en el dominio Cm. La posición Asn-297 del índice de la UE es un sitio de unión a carbohidratos unidos por N. El carbohidrato unido por N presenta una fuente potencial de variabilidad en una proteína expresada de forma recombinante debido a las posibles variaciones de lote a lote en la estructura del carbohidrato. En un intento de eliminar esta variabilidad potencial, Asn-297 se mutó a un resto de glutamina para evitar la unión de carbohidrato unido por N en esa posición del resto. El carbohidrato en el resto 297 también está implicado en la unión de Fc al FcRIII (Sondermann *et al.*, Nature 406: 267 (2000)). Por lo tanto, la retirada del carbohidrato debería disminuir la unión de Fc7 recombinante que contiene proteínas de fusión con respecto a los Fc γ R en general. Como
30 se ha mencionado anteriormente, el codón de parada en la secuencia de Fc7 se mutó a TAA.

Fc8 es idéntico a la región γ I de inmunoglobulina de tipo silvestre que se muestra en la SEC ID N^o: 6, excepto en que el resto de cisteína en la posición 220 del índice de la UE se reemplazó con un resto de serina. Esta mutación eliminaba el resto de cisteína que normalmente se une mediante enlaces disulfuro con la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. El uso de cualquiera de estos dominios de Fc específicos para la formación del antagonista de BLYS está dentro del alcance de la presente divulgación.
40

En el presente documento también se desvelan algunas formas de cremallera de leucina de estas moléculas. "Cremallera de leucina" es una expresión de la técnica usada para hacer referencia a una secuencia rica en leucina que mejora, promueve o conduce la dimerización o la trimerización de su pareja de fusión (por ejemplo, la secuencia o molécula a la que se fusiona o une la cremallera de leucina). En la técnica se han descrito diversos polipéptidos de cremallera de leucina. Véase, por ejemplo Landschulz *et al.*, Science, 240: 1759 (1988); Patente de Estados Unidos N.º 55.716.805; documento WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341: 24 (1989). Los expertos en la materia observaran que una secuencia de cremallera de leucina se puede fusionar ya sea en el extremo en las posiciones 5' o 3' del polipéptido.
50

Los polipéptidos desvelados en el presente documento también se pueden modificar de una manera al que se formen moléculas quiméricas mediante la fusión del polipéptido a otro, polipéptido o secuencia de aminoácidos.

De acuerdo con algunos aspectos, tal secuencia de polipéptido heterólogo o aminoácido es una que actúa para oligomerizar la molécula quimérica. En algunas realizaciones, tal molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir un anticuerpo etiqueta de forma selectiva. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido.
60

La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo de etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítipo.
65

Diversos polipéptidos de etiqueta y sus respectivos anticuerpos se conocen en la técnica. Algunos ejemplos incluyen

etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de etiqueta de HA de gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; un "péptido de epítipo de tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y la etiqueta de péptido de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci : USA, 87 : 6393-6397 (1990)].

10 Construcción de Conjugados de Péptido-Polímero

En algunos aspectos, la estrategia para la conjugación de un polímero, (por ejemplo, PEGilación) de péptidos sintéticos consiste en combinar, a través de la formación de una unión de conjugado en disolución, un péptido y un resto de PEG, portando cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva hacia la otra. Los péptidos se pueden preparar fácilmente con síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos se "preactivan" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan totalmente antes de reaccionar con el resto de PEG. La ligación del péptido con PEG normalmente se produce en fase acuosa y se puede controlar fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos PEGilados se pueden purificar fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizar mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas con desorción por láser.

En algunos aspectos, un péptido se une covalentemente a través de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido a un grupo reactivo terminal en el polímero, dependiendo principalmente de las condiciones de reacción, el peso molecular del polímero, etc. En el presente documento, el polímero con el grupo (s) reactivo se denomina polímero activado. El grupo reactivo reacciona de forma selectiva con grupos amino libre u otros grupos reactivos en el péptido. Algunos sitios reactivos potenciales incluyen: grupo amino N-terminal, grupos épsilon amino en restos de lisina, así como otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo, y otros grupos hidrófilos. Se entiende, sin embargo, que el tipo y la cantidad del grupo reactivo elegido, así como el tipo de polímero empleado, para obtener resultados óptimos, dependerá del péptido en particular empleado para evitar que el grupo reactivo reaccione con demasiados grupos particularmente activos en el péptido. En algunos aspectos, un resto reactivo, (por ejemplo, lisina (K), un aminoácido no natural, modificado, u otra molécula pequeña) se pueden sustituir en una posición adecuada para la conjugación.

En algunos aspectos, 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), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEC ID N°: 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEC ID N°: 9), o secuencias enumeradas en la FIG. 32 del documento WO 05/000351 tienen un grupo reactivo terminal.

En algunos aspectos, el péptido comprende al menos un 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 numeradas en la FIG. 32 del documento WO 05/000351. Los polipéptidos que se unen en conjunto pueden tener la misma secuencia o pueden tener secuencias diferentes y un grupo reactivo terminal. En algunas realizaciones, estos polipéptidos se pueden unir entre sí, opcionalmente, a través del uso de un conector.

Aunque que la conjugación se puede producir en cualquier aminoácido reactivo en el polipéptido, en algunas realizaciones, el aminoácido reactivo es lisina, que se une al grupo reactivo del polímero activado a través de su grupo épsilon-amino libre, o ácido aspártico o glutámico, que se une al polímero a través de un enlace amida. En algunas realizaciones, los aminoácidos reactivos del péptido no son restos de cisteína en las posiciones X2 y X1z.

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

En algunos aspectos, el polímero contiene solamente un único grupo que es reactivo. Esto ayuda a evitar la reticulación de moléculas de proteína. 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 a través de filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar derivados básicamente homogéneo. En otras realizaciones, el polímero contiene dos o más grupos reactivos con el fin de unir múltiples péptidos a la cadena

principal del polímero.

Una vez más, se puede usar filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar el derivado deseado en forma homogénea básicamente. En algunas realizaciones, el polímero se une covalentemente de forma directa al péptido sin el uso de un agente de reticulación multifuncional (habitualmente bifuncional). En algunas realizaciones, hay una proporción molar de 1:1 de cadena de PEG con respecto a péptido.

La reacción de modificación covalente se puede producir mediante cualquier método adecuado usado generalmente para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, preferentemente a pH de aproximadamente 5-9, más preferentemente 7-9, si los grupos reactivos en el péptido son grupos lisina. Por lo general, el proceso implica la preparación de un polímero activado (polímero que por lo general tiene al menos un grupo hidroxilo terminal a activar), preparación de un sustrato activo de este polímero, y a partir de ese momento la reacción del péptido con el sustrato activo para producir el péptido adecuado para la formulación. La reacción de modificación mencionada anteriormente se puede realizar con varios métodos, que pueden implicar una o más etapas. Algunos ejemplos de agentes de modificación que se pueden usar para producir el polímero activado en una reacción de una etapa incluyen cloruro de ácido cianúrico (2,4,6-tricloro-S-triazina) y fluoruro de ácido cianúrico.

En algunos aspectos, la reacción de modificación se produce en dos etapas en las que el polímero primero se hace reaccionar con un anhídrido de ácido tal como anhídrido succínico o glutárico para formar un ácido carboxílico, y a continuación el ácido carboxílico se hace reaccionar 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. Algunos ejemplos de tales compuestos incluyen N-hidroxisuccinimida, ácido 4-hidroxi-3-nitrobenceno sulfónico, y similares, y preferiblemente se usa N-hidroxisuccinimida o ácido 4-hidroxi-3-nitrobenceno sulfónico. Por ejemplo, PEG sustituido con monometilo se puede hacer reaccionar a temperaturas elevadas, de forma preferente aproximadamente 100-110 °C durante cuatro horas, con anhídrido glutárico. A continuación, el PEG sustituido con monometilo-ácido glutárico producido de este modo se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en presencia de un reactivo de carbodiimida tal como dicitohexil o isopropil carbodiimida para producir el polímero activado, glutarato de metoxipolietilenglicolil-N-succinimidilo, que a continuación se puede hacer reaccionar con el GH. Este método se describe con detalle en Abuchowski *et al.*, *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984). En otro ejemplo, el sustituido PEG con monometilo se puede hacer reaccionar con anhídrido glutárico seguido de reacción con ácido 4-hidroxi-3-nitrobenceno sulfónico (HNSA) en presencia de dicitohexil 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., RockfordIll., 1981), p. 97-100, y en Nitecki *et al.*, *High-Technology Route to Virus Vaccines* (American Society for Microbiology: 1986) con el título "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Applications".

En algunos aspectos, la unión covalente a grupos amino se consigue con químicas conocidas basadas en cloruro cianúrico, carbonil diimidazol, grupos reactivos de aldehído (alcóxido de PEG más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activados con succinimidilo, PEG activado con ditiocarbonato, 2,4,5-triclorofenilcloroformiato o PEG activado con P-nitrofenilcloroformiato. Algunos grupos carboxilo se derivatizan mediante acoplamiento de PEG-amina usando grupos carbodiimida. Algunos grupos sulfhidrilo se derivatizan mediante acoplamiento a PEG sustituido con maleimido (por ejemplo, alcoxi-PEG amina más 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo) tal como se describe en el documento WO97/10847 publicado el 27 de marzo de 1997, o PEG-maleimida disponible en el mercado en Nektar Technologies, San Carlos, CA (anteriormente Shearagua Polymers, Inc.). Como alternativa, los grupos amino libres en el péptido (por ejemplo grupos épsilon amino en restos de lisina) se pueden acoplar a PEG sustituido con N-hidroxisuccinimidilo (PEG-NHS disponible en Nektar Tecnologías) o se pueden tiolar con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y a continuación acoplar a derivados de PEG que contienen maleimida como se describe en Pedley *et al.*, *Br. J. Cancer*, 70: 1126-1130 (1994).

Muchos polímeros inertes, que incluyen, pero no se limitan a PEG, son adecuados para 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. Por lo general, el polímero no proteico es un polímero sintético hidrófilo, es decir, un polímero que no se encuentra de otro modo en la naturaleza. Sin embargo, también son útiles algunos polímeros que existen en la naturaleza y se producen con métodos recombinantes o *in vitro*, ya que son polímeros que se aíslan de fuentes nativas. Algunos polímeros de polivinilo hidrófilo entran dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Son particularmente útiles los éteres de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG); polioxilalquilenos tales como polioxi-etileno, polioxi-propileno, y copolímeros en bloque de polioxi-etileno y polioxi-propileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros sacáridos D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-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, hidroxietil almidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glucógeno, o la subunidad de polisacárido de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo, ácido

hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar, tales como polisorbitol y polimanitol; heparina o Heparon.

No es necesario que el polímero antes de conjugación sea soluble en agua, pero es preferente que lo sea, pero el conjugado final es preferentemente soluble en agua. Preferentemente, el conjugado presenta una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,01 mg/ml, y más preferentemente al menos aproximadamente 0,1 mg/ml, y todavía 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 fuera incompatible con infusión intravenosa, inyección, o inhalación si se pretende administrar el conjugado mediante tales vías.

El peso molecular del polímero puede variar hasta aproximadamente 100.000 D, y preferentemente es al menos aproximadamente 500 D, o al menos aproximadamente 1.000 D, o al menos aproximadamente 5.000 D. En algunas realizaciones, el d 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 eficaz del conjugado a conseguir, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificado) el polímero, y el grado de derivatización, es decir, el número de moléculas del polímero por péptido, y el sitio o sitios de unión al polímero en el péptido. En algunas realizaciones, se puede usar PEG ramificado para inducir un gran aumento en el tamaño eficaz de los péptidos. El PEG u otros conjugados de polímeros se pueden usar para aumentar la vida media, aumentar la solubilidad, estabilizar frente al ataque proteolítico, y reducir la inmunogenicidad.

Algunos polímeros de PEG funcionalizados para modificar los péptidos desvelados en el presente documento están disponibles en Nektar Technologies de San Carlos, CA (anteriormente Shearagua Polymers, Inc.). Tales derivados de PEG disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a, amino-PEG, ésteres de aminoácido de PEG, química de PEG-N-hidroxisuccinimida (NHS), PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, aminoácidos de PEG, succinimidilsuccinato de PEG, succinimidil propionato de PEG, éster de succinimidilo de PEG carboximetilado, succinimidil carbonato de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos de PEG, PEG-xicarbonilimidazol, PEG-carbonato de nitrofenilo, tresilato de PEG, PEG-glicidil éter, PEG-aldehído, PEG vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-ortopiridil-disulfuro, PEG heterofuncionales, derivados de vinilo PEG, PEG silanos, y PEG fosfólidos. Las condiciones de reacción para acoplamiento de 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 los 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 que antigenicidad de la unión, idoneidad para análisis, etc. Algunas instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado en particular están disponibles en el fabricante.

Los conjugados se pueden caracterizar por SDS-PAGE, filtración en gel, RMN, formación de mapas con tripsina, cromatografía líquida-espectrofotometría de masas, y en ensayos biológicos *in vitro*. Por ejemplo, el alcance de la conjugación de PEG se puede mostrar con SDS-PAGE y filtración en gel, y a continuación analizar mediante RMN, que tiene un pico de resonancia específico para los hidrógenos de metileno del PEG. El número de grupos PEG en cada molécula se puede calcular a partir del espectro de RMN o espectrometría de masas. La electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS al 10 % se realiza de forma apropiada en Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM como tampón de elución. Para demostrar que el resto está PEGilado, se puede realizar formación de mapas con tripsina. Por lo tanto, los péptidos PEGilados se digieren con tripsina a la proporción de proteína/enzima de 100 a 1 en base de 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 la separación en Nucleosil C18 de HPLC (4,6 mm veces. 150 mm, 5. mu., 100A). El cromatograma se compara con el del material de partida no PEGilado. Cada pico se puede analizar a continuación mediante espectrometría de masas para verificar el tamaño del fragmento en el pico. El fragmento o fragmentos que llevan grupos PEG por lo general no se retienen en la columna de HPLC después de inyección y desaparecen del cromatógrafo. Tal desaparición del cromatógrafo es una indicación de PEGilación en ese fragmento en particular que debería contener al menos un resto de lisina. A continuación, los péptidos PEGilados se pueden someter a ensayo para la capacidad de unirse al BLYS con métodos convencionales.

En algunos aspectos, los conjugados se purifican por cromatografía de intercambio iónico, (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico. La química de muchos de los resultados de PEG activado de forma electrófila da como resultado una reducción de la carga de grupo amino del producto PEGilado. Por lo tanto, se puede usar 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 sin reaccionar. En una realización, las especies con diferentes niveles de PEGilación se resuelven de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 96/34015 (Solicitud Internacional N.º PCT/US96/05550 publicada el 31 de octubre 1996). Las especies heterólogas de los conjugados se purifican entre ellas de la misma manera.

En algunos aspectos, 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 C-terminal (K) del polipéptido. En algunas realizaciones, el resto de lisina se añade al extremo C-terminal del polipéptido de 17-mer, mientras que en otras realizaciones, Xi está sustituido con lisina. En algunas realizaciones, el polímero reacciona con el extremo N-terminal. En una realización preferente, el conjugado se genera utilizando los métodos de derivatización y purificación descritos en los Ejemplos que siguen a continuación.

En un aspecto, la divulgación proporciona cualquiera de los conjugados descritos anteriormente formados por sus partes componentes, es decir, uno o más péptido(s) unidos de forma covalente a una o más molécula(s) de polímero, sin ninguna materia extraña en la estructura molecular covalente del conjugado.

Los métodos y artículos de fabricación de la presente divulgación, uso o incorporan, un anticuerpo que se une a BLYS o uno o más de sus tres receptores. En consecuencia, aquí se describen métodos para generar tales anticuerpos.

El BLYS o receptor de BLYS que se usará para producción de, o identificación sistemática de, anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del antígeno o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como se ha descrito anteriormente, se sabe que la secuencia de BLYS y la secuencia de los receptores de BLYS son los límites de los diferentes dominios de estos polipéptidos. Como inmunógenos se pueden usar fragmentos peptídicos del dominio extracelular (ECD). Basándose en estas secuencias y descripciones de dominio conocidos, un experto en la materia puede expresar el BLYS o polipéptidos receptores de BLYS y fragmentos de los mismos para uso para producir anticuerpos.

Para generar anticuerpos frente a BLYS o sus receptores, como inmunógenos se pueden usar polipéptidos de longitud completa o fragmentos de péptidos de 6 o más restos de longitud para producir anticuerpos en roedores incluyendo ratones, hámsteres y ratas, en conejo, cabra, u otro animal adecuado. El BLYS soluble o fragmentos polipeptídicos o inmunogénicos de receptor BLYS del mismo se pueden expresar en células hospedadoras adecuadas tales como bacterias o células eucariotas. En una realización, en *E. coli* se producen BLYS de longitud completa solubilizados en detergente humanos y murinos y se usan para inmunizar e identificar sistemáticamente hibridomas que producen anticuerpos BLYS.

Como alternativa, o adicionalmente, se pueden usar linfocitos B o líneas celulares que expresan BLYS o receptores de BLYS en su superficie celular para generar y/o identificar sistemáticamente, anticuerpos. Para producir anticuerpo de unión a BLYS también se pueden usar otras formas de BLYS útiles para generar anticuerpos, tales como metodología de presentación de fagos que son evidentes para los expertos en la materia. Los anticuerpos que se unen a BLYS o los receptores de BLYS pueden ser quiméricos, humanizados, o humanos. Tales anticuerpos y métodos de generación de los mismos se describen con más detalle a continuación.

Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzoiolsulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOC12, o R1N=C=NR, en el que R y R' son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados mediante combinación, por ejemplo, de 100 μ g o 5 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 más tarde los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre a los animales y se analiza el suero para el 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 a través de un reactivo de reticulación diferente. Algunos conjugados también se pueden preparar en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, algunos agentes de agregación como alumbre se usan de forma adecuada para mejorar la respuesta inmune.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población básicamente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden 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 que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos separados.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la

proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos fusionan 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)).

5 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras, sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo
10 general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son las que se fusionan de forma eficaz, apoyan la producción de alto nivel estable de anticuerpo con las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal
15 como medio HAT.

Entre estas, algunas líneas de células de mieloma preferentes son líneas de mieloma murino, tales como las obtenidas a partir de tumores de ratón de MOPC- 21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos
20 Tipo, Rockville, Mariland USA. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de 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., New York, 1987)).

25 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de
30 Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden cultivar con métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Algunos medios de cultivo adecuados para esta finalidad incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640.
35 Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por
40 ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se podría colocar en vectores de
45 expresión, que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Algunos artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol Revs.*, 130: 151-188 (1992).
50

En un aspecto adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas que se describen 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
55 aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Algunas publicaciones posteriores describen la producción de alta afinidad (intervalo nM) de anticuerpos humanos mediante barajado de cadena (Marks *et al.*, *Biol Z'echnology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construcción de 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
60 tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de decodificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido que no es
65 inmunoglobulina.

Por lo general, tales polipéptidos que no son inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por 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 para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

5 En la técnica se han descrito algunos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de "importación", que por lo general se obtienen a partir de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar básicamente 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)), por sustitución de secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) en la que básicamente 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 por lo general son 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.

20 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se identifica sistemáticamente frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que está más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chotia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada en particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 15-1: 2623 (1993)).

30 Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método deferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas.

35 Algunos modelos tridimensionales de inmunoglobulina normalmente están disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay algunos programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el 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 a su antígeno. De esta manera, los restos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como aumento de la afinidad por el antígeno (s) diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directa y lo más sustancialmente en la influencia en la unión al antígeno.

45 Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción endógena de anticuerpos.

50 La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de estimulación con 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.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

60 Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en cualquiera de un gen de proteína de revestimiento principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, algunas selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo

tanto, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B.

La presentación de fagos se puede realizar 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). Para presentación de fagos se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes de V. Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos de anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes de V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una matriz diversas de antígenos (incluyendo autoantígenos) básicamente siguiendo las técnicas que se describen en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Véanse también las Patentes de Estados Unidos N.º 5.565.332 y 5.573.905. Algunos anticuerpos humanos también se pueden generar linfocitos B activado *in vitro* (véanse las Patentes de Estados Unidos N.º 5.567.610 y 5.229.275).

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. De forma tradicional, estos fragmentos se derivaban a través de 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 ahora se pueden producir directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, algunos fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar de forma química para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, algunos fragmentos de F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo son evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de una sola cadena (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N.º 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5641.870 por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Algunos anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes del marcador de superficie de linfocitos B. Otros de estos anticuerpos se pueden unir a un primer marcador de linfocitos B y se pueden unir además a un segundo marcador de superficie de linfocitos B. Como alternativa, una rama de unión al marcador de linfocitos anti-B se puede combinar con una rama que se une a una molécula de estimulación en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrarse en mecanismos de defensa celular para los linfocitos B. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para los linfocitos B.

Estos anticuerpos poseen una rama de unión a marcador de linfocitos B y una rama que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón, alcaloides de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo).

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂). En la técnica se conocen algunos métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)).

Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía por afinidad, es bastante compleja, y los rendimientos del producto son bajos. Algunos procedimientos similares se desvelan en el documento WO93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza 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 la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN 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 cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de decodificación para dos o las tres cadenas polipeptídicas

en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia en particular.

5 En un aspecto preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están formados por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se encontró 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 solamente en una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este es lo que se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre 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 N.º 5.731.168, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo se puede modificar con ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se sustituye con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

25 Algunos anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Por ejemplo, se ha propuesto que tales anticuerpos dirigen células del sistema inmune hacia células no deseadas (Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980), y para tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. En la técnica se conocen bien algunos agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

30 En la bibliografía también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, algunos anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.* *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que algunos anticuerpos intactos se cortan de forma proteolítica para generar fragmentos de F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditioles vecinales y para evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos de Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se vuelve a convertir a continuación en el Fab'-tiol mediante 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 se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

45 Los avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos de Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar de forma química para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento de 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 este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadena la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

50 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica.

55 Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo.

60 La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso

de dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol, 152: 5368 (1994).

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

5 Se contemplan modificación (s) de secuencia de aminoácidos de antagonistas de proteínas o péptidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo o antagonista de unión a BLYS. Algunas variantes de secuencia de aminoácidos del antagonista se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico antagonista, o
10 mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del antagonista. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del antagonista, tales como el cambio del número o posición de sitios de
15 glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del antagonista que son localizaciones precedentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina" como lo describen Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados
20 tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga neutra o negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional con respecto a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo de variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos se determina previamente, no es necesario determinar previamente la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una
25 mutación en un sitio dado, la mutagénesis de barrido o aleatoria se realiza en el codón o región diana y las variantes de antagonista expresadas se identifican sistemáticamente para su actividad deseada.

Algunas inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo-terminal con una longitud
30 que varía de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencias de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un antagonista con un resto de metionilo N-terminal o el antagonista fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula antagonista incluyen la fusión al extremo N o C-terminal del antagonista de una enzima, o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del antagonista.
35

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula antagonista sustituido por diferentes restos. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución de antagonistas de anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Algunas sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 con el encabezado
40 "sustituciones precedentes". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como adicionalmente se describe a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden identificar sistemáticamente.

45 Algunas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del antagonista se consiguen mediante selección de sustituciones que difieren de forma significativa en su efecto al mantener (a) la estructura de la cadena principal de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val,
50 leu, ile; (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr; (3) ácidos: asp, glu; (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg; (5) restos que influyen orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe. Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en mantener la conformación correcta del antagonista también se puede
55 sustituir, por lo general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. Por el contrario, se puede añadir un enlace o enlaces de cisteína al antagonista para mejorar su estabilidad (en particular cuando el antagonista es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

Un tipo particularmente preferente de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de región
60 hipervariable de un anticuerpo precursor. Por lo general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del que se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este
65 modo se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes presentan fagos se

identifican sistemáticamente por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen de forma significativa a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a identificación sistemática tal como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del antagonista altera el patrón de glicosilación original del antagonista. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el antagonista, y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el antagonista.

La glicosilación de polipéptidos por lo general se une a N o se une a O. Unido a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripeptídicas de asparagina-X- serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilisina.

La adición de sitios de glicosilación al antagonista se consigue de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del antagonista original (para sitios de glicosilación unidos a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del antagonista se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación con mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una versión anterior del antagonista o no variante preparada.

Puede ser deseable modificar el antagonista con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del antagonista. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo antagonista. Como alternativa o adicionalmente, se pueden introducir un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercadenas en esta región.

El anticuerpo homodimérico generador de este modo puede tener un aumento de la capacidad de internalización y/o aumento de la muerte celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron *et al.* J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B.J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Algunos anticuerpos homodiméricos con aumento de la actividad antitumoral también se pueden preparar usando agentes de reticulación heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, un anticuerpo se puede modificar con ingeniería para que tenga regiones de Fc dobles y de ese modo puede tener un aumento de la capacidad de lisis de complemento y capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la vida media en suero del antagonista, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el antagonista (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, -IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable del aumento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Ensayos

Las concentraciones de linfocitos B periféricos se determinan mediante un método de FACS que hace recuento de las células CD3-/CD40+.

El porcentaje de células CD3-CD40 + B de linfocitos totales en las muestras se puede obtener mediante la siguiente estrategia de selección. La población de linfocitos está marcada en el diagrama de dispersión directa/dispersión lateral para definir la Región 1 (R1). Usando sucesos en R1, se muestran representaciones de puntos de intensidad de fluorescencia para marcadores CD40 y CD3. Se usan controles de isotipo marcados con fluorescencia para determinar respectivos puntos de corte para positividad de CD40 y CD3.

Análisis de FACS

Medio millón de células se lavan y se vuelven a suspender en 1001 de tampón FACS, que solución salina tamponada con fosfato con BSA al 1 %, que contiene 5 ul de anticuerpo de tinción o control. Todos los anticuerpos de tinción, incluyendo controles de isotipo, se obtienen en PharMingen, San Diego, CA. La expresión de BLYS humano se evalúa mediante tinción con Rituxan y Commat; junto con anticuerpo secundario de IgG1 anti-humana conjugado con FITC.

El análisis de FACS realiza usando FACScan y Cell Quest FACS (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Todos los linfocitos se definen en las dispersiones de luz directa y lateral, mientras que todos los linfocitos B se definen con la expresión de B220 en la superficie celular.

La supresión y recuperación de linfocitos B se evaluó mediante el análisis de recuentos de linfocitos B periféricos y análisis de células hBLYS + B mediante FACS en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea diariamente durante la primera semana después de la inyección y, a partir de este momento, semanalmente. Los niveles en suero del anticuerpo variante de 2H7 inyectado se controlan.

Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de BLYS tales como anticuerpos de unión a BLYS usadas de acuerdo con la presente divulgación se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes 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 octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; 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, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, PLURONICTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no influyen de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, citoquina o agente inmunosupresor (por ejemplo, uno que actúa sobre los linfocitos T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se une a los linfocitos T, por ejemplo, uno que se una a LFA-1). La cantidad eficaz de tales 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 generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración que se describen en el presente documento o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones empleadas hasta el momento.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por con técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Algunos ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, matrices que se presentan como artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2 hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de L ácido glutámico y L- glutamato de etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables formadas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D- (-) -3-hidroxitútrico.

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

Tratamiento de Enfermedades

Enfermedades

Los agentes anti-CD 20 y los antagonistas de BLYS mencionados en las reivindicaciones son útiles para tratar trastornos autoinmunitarios regulados por linfocitos B. Algunas enfermedades autoinmunitarias reguladas por linfocitos B incluyen artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática), psoriasis, dermatitis incluyendo dermatitis atópica; urticaria crónica autoinmunitaria, polimiositis/dermatomiositis, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia sistémica y esclerosis, respuestas asociadas a enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria en adulto (ARDS), meningitis, rinitis alérgica, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eczema, asma, afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus (incluyendo nefritis, no renal, discoide, alopecia), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, respuestas inmunes asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas 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 inmune que incluye anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión orgánica múltiple, miastenia grave, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo a trasplante de órganos sólidos (incluyendo el tratamiento previo de títulos de anticuerpos reactivos para panel elevado, depósito de IgA en tejidos, etc.), enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), pénfigoide bulloso, pénfigo (incluyendo todos, vulgar, foliáceo), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, arteritis de células gigantes, nefritis compleja inmune, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunitaria, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias que incluyen tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo 1 también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis linfocítica intersticial (VIH), bronquiolitis obliterante (no trasplante) con respecto a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), Vasculitis de vasos medios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y Poliarteritis Nodosa), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), glomerulonefritis rápidamente progresiva, cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, ELA, enfermedad de la arteria coronaria.

El nivel deseado de supresión de linfocitos B dependerá de la enfermedad. Preferentemente, la supresión de linfocitos B es suficiente para prevenir la evolución de la enfermedad durante al menos 2 meses, más preferentemente 3 meses, incluso más preferentemente 4 meses, más preferentemente 5 meses, incluso más preferentemente 6 o más meses. En realizaciones incluso más preferentes, la supresión de linfocitos B es suficiente para aumentar el tiempo de remisión en al menos 6 meses, más preferentemente 9 meses, más preferentemente un año, más preferentemente 2 años, más preferentemente 3 años, incluso más preferentemente 5 o más años. En la realización más preferente, la supresión de linfocitos B es suficiente para curar la enfermedad. En realizaciones preferentes, la supresión de linfocitos B en el paciente autoinmunitario es transitoria en al menos aproximadamente un 75 % y más preferentemente, un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % e incluso un 100 % del nivel de la medida inicial antes del tratamiento.

Para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, puede ser deseable modular el grado de supresión de linfocitos B, dependiendo de la enfermedad y/o la gravedad de la afección en el paciente individual, mediante el ajuste de la dosificación del fármaco inmunosupresor o el antagonista de BLYS. Por lo tanto, la supresión de linfocitos B puede ser completa, pero no tiene por qué serlo. O, se puede desear una supresión total de linfocitos B en el tratamiento inicial, pero en tratamientos posteriores, la dosificación se puede ajustar para conseguir solamente una supresión parcial. En una realización, la supresión de linfocitos B es al menos un 20 %, es decir, un 80 % o menos de los linfocitos B permanecen en comparación con el nivel de medida inicial antes del tratamiento. En otras realizaciones, la supresión de linfocitos B es de un 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o superior.

Preferentemente, la supresión de linfocitos B es suficiente para detener la progresión de la enfermedad, más preferentemente para aliviar los signos y síntomas de la enfermedad en particular en tratamiento, incluso más preferentemente para curar la enfermedad.

Para aplicaciones terapéuticas, el fármaco inmunosupresor y composiciones de antagonista de BLYS desveladas en el presente documento se pueden usar en terapia de combinación con fármacos adicionales, tales como fármacos antiinflamatorios, incluyendo DMARDS y otros productos biológicos. Los métodos de tratamiento anteriores se pueden administrar en combinación con otras formas de terapia convencional para enfermedad autoinmunitaria, ya

sea de forma consecutiva con, terapia pre- o post-convencional.

Un paciente se alivia o se trata de forma satisfactoria de enfermedades autoinmunitarias reguladas por linfocitos B con la presente invención si hay una mejora mensurable en los síntomas u otros criterios aplicables después de la administración de las composiciones de la invención en comparación con la situación antes del tratamiento. El efecto del tratamiento puede ser evidente en 3-10 semanas después de la administración de las composiciones de la invención. Los criterios aplicables para cada enfermedad son bien conocidos para el médico experto en la materia apropiada. Por ejemplo, el médico puede controlar al paciente tratado para evidencia clínica o serológica de la enfermedad, como marcadores serológicos de la enfermedad, recuento sanguíneo completo, incluyendo recuento de linfocitos B, y niveles de inmunoglobulina en suero. Los niveles de IgG e IgM en suero se reducen en antagonista de BLYS, como ratones tratados con ataccept. Los pacientes humanos que responden al tratamiento con ataccept tratamiento también muestran una reducción en los niveles de IgG e IgM en suero.

El médico experto en la enfermedad apropiada conoce los parámetros para evaluar la eficacia o éxito del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o relacionada autoinmunitaria. Por lo general, el médico experto buscará la reducción de los signos y síntomas de la enfermedad específica. Los siguientes son a modo de ejemplo.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmunitaria de etiología desconocida. La mayoría de los pacientes con RA sufren un curso crónico de la enfermedad que, incluso con terapia, puede dar como resultado destrucción de articulaciones progresiva, deformidad, discapacidad e incluso muerte prematura. Los objetivos de la terapia para RA son prevenir o controlar el daño articular, prevenir la pérdida de la función y disminuir el dolor. La terapia inicial de RA por lo general implica la administración de uno o más de los siguientes fármacos: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides (mediante inyección en la articulación), y prednisona a dosis bajas. Véase "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheumatism* 46 (2): 328-346 (febrero de 2002). La mayoría de los pacientes con RA recién diagnosticada comienzan la terapia con fármacos antirreumáticos (DMARD) que modifican la enfermedad dentro de los 3 meses del diagnóstico.

Los DMARD usados normalmente en RA son hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), azatioprina, D-penicilamina, Oro (oral), Oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, inmunoabsorción de proteína A estafilocócica.

Dado que el organismo produce factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) durante RA, se han usado inhibidores del TNF α para terapia de esa enfermedad. El etanercept (ENBREL) es un fármaco inyectable aprobado en Estados Unidos para terapia de la RA activa. El etanercept se une al TNF α y sirve para retirar la mayor parte del TNF α de las articulaciones y la sangre, evitando de este modo que el TNF α estimule la inflamación y otros síntomas de artritis reumatoide.

El etanercept es una proteína de fusión de "proteína de fusión de Fc " que consiste en la parte de unión del ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kD (p75) humano (TNFR) unido a la parte de Fc de una humana Ig G1.

El infliximab, comercializado con el nombre de marca REMICADE, es un fármaco inmunosupresor prescrito para tratar la RA y la enfermedad de Crohn. El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al TNF y reduce la inflamación en el organismo mediante dirección y unión al TNF α que produce inflamación.

El adalimumab (HUMIRATM, Abbott Laboratories), conocido anteriormente como D2E7, es un anticuerpo monoclonal humano que se une al TNF α y está aprobado para reducir los signos y síntomas y para inhibir la progresión del daño estructural en adultos con RA de moderada a seriamente activa que han tenido una respuesta insuficiente a uno o más DMARD modificadores de enfermedad tradicionales.

El tratamiento de la artritis reumatoide mediante la administración de fármacos inmunosupresores y un antagonista de BLYS se puede realizar en conjunto con terapia con uno o más de los fármacos mencionados anteriormente para la RA. Para la artritis reumatoide, por ejemplo, algunas medidas para progreso en el tratamiento pueden incluir el número de articulaciones hinchadas y sensibles y el periodo de rigidez matutina. Los pacientes se pueden examinar con respecto a cuánto se han deteriorado las articulaciones en manos y pies usando rayos X y un sistema de puntuación conocido como sistema de puntuación Sharp. Otro sistema de puntuación se basa en los criterios del Colegio Americano de Reumatología para evaluar respuestas a terapias.

Un método para evaluar la eficacia del tratamiento en la RA se basa en criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), que mide el porcentaje de mejora en articulaciones sensibles e hinchadas, entre otros factores. El paciente con RA se puede puntuar en por ejemplo, ACR 20 (20 por ciento de mejora) en comparación con tratamiento sin anticuerpo (por ejemplo, medida inicial antes del tratamiento) o tratamiento con placebo. Otras formas de evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpo incluyen puntuación con rayos X tal como la puntuación con rayos X de Sharp usada para puntuar el daño estructural tal como deterioro óseo y estrechamiento del espacio entre articulaciones. Los pacientes también se pueden evaluar para la prevención por la mejora de la discapacidad basándose en la puntuación del Cuestionario de Evaluación de Salud [HAQ], puntuación de AIMS, SF-36 en

periodos de tiempo durante o después del tratamiento. Los criterios de ACR 20 pueden incluir mejora de un 20 % tanto en el recuento de articulaciones sensibles (dolorosas) como el recuento de articulaciones hinchadas más una mejora de un 20 % en al menos 3 de 5 medidas adicionales:

- 5 1. evaluación del dolor del paciente mediante escala analógica visual (VAS),
2. evaluación global del paciente de actividad de enfermedad (VAS),
3. evaluación global por parte del médico de la actividad de enfermedad (VAS),
4. discapacidad autoevaluada del paciente medida con el Cuestionario de Evaluación de Salud, y
- 10 5. reactivos de fase aguda, CRP o ESR.

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

15 La artritis psoriática tiene características radiográficas únicas y distintas. Para la artritis psoriática, el deterioro de las articulaciones y el estrechamiento del espacio entre articulaciones también se pueden evaluar con la puntuación de Sharp. Los anticuerpos de unión a BLYS humanizados desvelados en el presente documento se pueden usar para prevenir el daño articular así como para reducir signos de enfermedad y síntomas del trastorno.

20 Otro aspecto más de la divulgación es un método para tratar Lupus o LES mediante la administración, al paciente que padece LES, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de BLYS en combinación con un fármaco inmunosupresor de la invención. Las puntuaciones de SLEDAI proporcionan una cuantificación numérica de la actividad de la enfermedad. Se sabe que el SLEDAI es un índice ponderado de 24 parámetros clínicos y de laboratorio que se correlaciona con la actividad de la enfermedad, con un intervalo numérico de 0-103. Véase Bryan Gescuk y John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" en Current Opinion en Rheumatology 2002, 14: 515-521. Se cree que algunos anticuerpos para ADN bicatenario causan exacerbaciones renales y otras manifestaciones de lupus. Los pacientes sometidos a tratamiento con anticuerpos se pueden controlar para tiempo hasta exacerbación renal, que se define como un aumento significativo, reproducible en la creatinina en suero, proteína en orina o sangre en orina. Como alternativa o además, los pacientes se pueden controlar para detectar los niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos para ADN bicatenario. Algunos tratamientos para LES incluyen dosis elevadas de corticosteroides y/o ciclofosfamida (HDCC). Para el lupus eritematoso sistémico, los pacientes se pueden controlar para detectar niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos para ADN bicatenario.

35 Un aspecto en particular de la presente divulgación es el tratamiento de nefritis por lupus con una combinación de fármacos inmunosupresores y un antagonista de BLYS, tal como atacicept.

40 Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos de las articulaciones, que incluyen espondilitis anquilosante, artritis psoriática y enfermedad de Crohn. El éxito del tratamiento se puede determinar con herramientas validadas de medida de evaluación de paciente y médico.

45 Una enfermedad autoinmunitaria adicional que se puede tratar usando la presente invención es la psoriasis. En la actualidad se usa en diversas medicaciones para tratar la psoriasis; el tratamiento se diferencia directamente en relación a la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con una forma de psoriasis más leve por lo general utilizan tratamientos tópicos, tales como esteroides tópicos, antralina, calcipotrieno, clobetasol, y tazaroteno, para gestionar la enfermedad mientras que los pacientes con psoriasis moderada y grave es más probable que usen terapias sistémicas (metotrexato, retinoides, ciclosporina, PLTVA y UVB). También se usan breas. Estas terapias tienen una combinación de preocupaciones de seguridad, regímenes que requieren mucho tiempo, o procesos de tratamiento inconvenientes. Además, algunos requieren equipos costosos y espacio dedicado en las instalaciones de la oficina. Algunas medicaciones sistémicas pueden producir efectos secundarios graves, incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, supresión de médula ósea, enfermedad hepática, enfermedad renal y trastornos gastrointestinales. Además, el uso de fototerapia puede aumentar la incidencia de cánceres de piel. Además de las molestias y malestar asociados al uso de terapias tópicas, la fototerapia y los tratamientos sistémicos requieren la realización de ciclos en pacientes con y sin terapia y el control de la exposición de por vida debido a sus efectos secundarios.

55 La eficacia del tratamiento para la psoriasis se evalúa mediante el control de cambios en los signos clínicos y síntomas de la enfermedad incluyendo cambios de la Evaluación Global del Médico (PGA) y puntuaciones de Área de Psoriasis de Índice de Gravedad (PASI), Evaluación de Síntomas de Psoriasis (PSA), en comparación con la afección en la medida inicial. El paciente se puede evaluar periódicamente durante todo el tratamiento en la escala analógica Visual usada para indicar el grado de prurito experimentado en momentos específicos.

Dosificación

65 Dependiendo de la indicación a tratar y factores relevantes para la dosificación con los que un médico con experiencia en el campo estaría familiarizado, los antagonistas de BLYS y fármacos inmunosupresores desvelados

en el presente documento se administran a una dosificación que es eficaz para el tratamiento de esa indicación a la vez que se minimizan la toxicidad y los efectos secundarios. Por lo general, el antagonista BLYS desvelado en el presente documento se administra a un paciente humano a un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Expresado de forma alternativa, un intervalo de dosificaciones preferente para el antagonista de BLYS es de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 190 mg por dosis. En una realización preferente, las dosificación es de aproximadamente 150 mg por dosis para el antagonista de BLYS.

La invención comprende una combinación de administración simultánea y secuencial del agente anti-CD 20 y de la antagonista de BLYS definidos en las reivindicaciones (ambos denominados en el presente documento restos de tratamiento). En la administración secuencial, los restos de tratamiento se pueden administrar en cualquier orden, es decir, agentes anti-CD 20 en primer lugar seguido de antagonista de BLYS. El paciente se puede tratar con un fármaco y se puede controlar la eficacia antes del tratamiento con el un fármaco. Por ejemplo, si el agente anti-CD 20 produce una respuesta parcial, el tratamiento puede ir seguido con el antagonista de BLYS para conseguir una respuesta completa, y viceversa. Como alternativa, al paciente se le pueden administrar inicialmente ambos fármacos y posteriormente la dosificación se puede realizar solamente con uno o el otro fármaco.

Para acondicionar al paciente para que tolere los fármacos y/o para reducir la aparición de efectos adversos tales como síntomas relacionados con la infusión que se producen por las administraciones iniciales y subsiguientes del compuesto terapéutico, al mamífero con necesidad del mismo se le puede administrar una primera dosis de acondicionamiento o dosis inicial de uno o ambos fármacos y a continuación se le puede administrar al menos una segunda dosis terapéuticamente eficaz de uno o ambos fármacos en el que la segunda dosis y las posteriores son más elevadas que la primera dosis. La primera dosis sirve para acondicionar al mamífero para que tolere la segunda dosis terapéutica más elevada. De esta manera, el mamífero es capaz de tolerar dosis más elevadas del compuesto terapéutico que se le podrían administrar 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 asociados a 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 presenta 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, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dificultad para respirar, mialgia y escalofríos.

Más allá de un régimen de dosis de acondicionamiento, hay una serie de otros regímenes que se pueden seguir para conseguir el alivio de la enfermedad de la presente invención. Uno de estos enfoques es un curso de tratamiento corto de un fármaco inmunosupresor, seguido de reducción gradual, seguido de tratamiento con la combinación de agente anti-CD20 y el antagonista de BLYS. Por ejemplo, se pueden administrar 1000-1500 mg de corticosteroides por vía oral, dos veces al día durante cuatro semanas, seguido de reducción gradual de 5 mg/semana a 10 mg/día en el transcurso de 10 semanas. Una vez que ha llegado el momento de comenzar con el antagonista de BLYS y/o el agente anti-CD20, una dosis de carga puede ser apropiada. En particular, el ataccept se puede administrar dos veces por semana durante cuatro semanas seguido de administración semanal durante un periodo de tiempo prolongado, tal como 48 semanas. Se pueden realizar avances semanales en la dosificación hasta una dosis máxima de 1000 mg, 3 veces al día si el recuento de glóbulos blancos del paciente se mantiene en niveles aceptables (es decir, por encima de $3,0 \times 10^9/l$ o $3000/mm^2$).

Vía de administración

Los antagonistas de BLYS y el agente anti-CD20 se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como mediante administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por días subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, o inhalación. Los fármacos inmunosupresores con formulación apropiada también se pueden administrar por vía oral o por vía tópica. El antagonista de BLYS y algunos agentes anti-CD 20 por lo general se administrarán mediante administración intravenosa o subcutánea. Los diferentes restos de tratamiento se pueden administrar por la misma o diferentes vías.

Artículos de Fabricación y Kits

Otra realización de la invención es un artículo de fabricación que comprende un antagonista de BLYS y agente anti-CD20 (como se define en las reivindicaciones) para tratar un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B como se ha desvelado anteriormente. En una realización específica, el artículo de fabricación contiene un polipéptido de fusión de TACi-Fc que comprende la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y RITUXAN® para el tratamiento de LES.

El artículo de fabricación comprende al menos un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente, tal como se define en las reivindicaciones. Algunos recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados con diversos materiales tales como vidrio o plástico. El

recipiente contiene una composición de la invención que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B, por ejemplo, nefritis por lupus o artritis reumatoide. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para administrar la composición al paciente. Además, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para ensayos de eliminación de linfocitos B. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un fármaco inmunosupresor y un antagonista de BLYS de la divulgación. Se pueden incluir algunos recipientes adicionales que contiene, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso previsto *in vitro* o de diagnóstico.

Ejemplos Experimentales

Ejemplo 1

Producción de Antagonista de BLYS

Se generaron cuatro versiones truncadas amino terminales de TACI-Fc. Las cuatro tenían una secuencia modificada humana de señal de activador de plasminógeno tisular como se desvela en el documento WO 02/094852 (SEC ID N°: 41) fusionada con el resto de aminoácido número 30 de la SEC ID N°: 2. Sin embargo, las cuatro proteínas se diferenciaban en la posición del punto en la que Fc5 se fusionaba con la secuencia de aminoácidos de TACI de la SEC ID N°: 2. La Tabla 1 resume las estructuras de las cuatro proteínas de fusión.

Tabla 1

Proteínas de Fusión de TACI Fc	
Denominación de TACI-Fc	Restos de aminoácidos de TACI
TACI(d1-29)-Fc5	30 a 154 de la SEC ID N°: 2
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	30 a 106 de la SEC ID N°: 2
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	30 a 110 de la SEC ID N°: 2
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	30 a 119 de la SEC ID N°: 2

Se generaron casetes de expresión que codifican proteína con PCR de solapamiento usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Horton *et al.*, Gene 77: 61 (1989)). Como moldes de PCR se usaron una molécula de ácido nucleico que codifica TACI y una molécula de ácido nucleico que codifica Fc5. Los cebadores de oligonucleótido se identifican en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

Cebadores de Oligonucleótidos Usados para Producir Proteínas de Fusión de TACI				
Denominación de TACI-Fc	Denominaciones del Oligonucleótido			
	5' TACI	3' TACI	5' Fc5	3' Fc5
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24,903	ZC24,955	ZC24,952	ZC24,946
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24,903	ZC24,951	ZC24,949	ZC24,946
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,978	ZC28,979	ZC24,946
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,981	ZC28,980	ZC24,946

Tabla 3

Secuencias de Oligonucleótidos		
Cebador	Secuencia de Nucleótidos	SEC ID N.º
ZC24,903	5' TATTAGGCCCGCCACCATGGATGCAATGA 3'	27
ZC24,955	5' TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3'	28
ZC24,952	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAATCTTCA 3'	29

ZC24,946	5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	30
ZC24,951	5' TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	31
ZC24,949	5' ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	32
ZC28,978	5' TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTTCACACA 3'	33
ZC28,979	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	34
ZC28,981	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	35
ZC28,980	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	36

La primera ronda de amplificaciones de PCR consistía en dos reacciones para cada una de las cuatro versiones truncadas amino terminales. Las dos reacciones se realizaron por separado usando los oligonucleótidos de TACI en las posiciones 5' y 3' en una reacción, y los oligonucleótidos de Fc5 en las posiciones 5' y 3' en otra reacción para cada versión. Las condiciones de la primera ronda de amplificación de PCR fueron las que siguen a continuación. A un volumen final de 25 µl se le añadieron aproximadamente 200 ng de molde de ADN, 2,5 µl de tampón de reacción de Pfu 10x (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de cada oligonucleótido en la posición 5' y oligonucleótido en la posición 3', 20 µM, y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil de amplificación térmica consistía en 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión de 2 minutos a 72 °C. Los productos de reacción se fraccionaron con electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños predichos se escindieron del gel y se recuperaron usando un Kit de Extracción en Gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La segunda ronda de amplificación PCR, o reacción de amplificación de PCR de solapamiento, se realizó usando los fragmentos purificados de gel de la primera ronda de PCR como molde de ADN. Las condiciones de la segunda ronda de amplificación de PCR fueron las que siguen a continuación. A un volumen final de 25 µl se le añadieron aproximadamente 10 ng de molde de ADN de cada uno del fragmento de TACI y el fragmento de Fc5, 2,5 µl de tampón de reacción de Pfu 10x (Stratagene), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 0,5 µl de 20 µM de cada ZC24,903 (SEC ID N°: 27) y ZC24,946 (SEC ID N°: 30) y 0,5 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades, Stratagene). El perfil de amplificación térmica consistía en 94 °C durante 1 minuto, 35 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión de 2 minutos a 72 °C. Los productos de reacción se fraccionaron con electroforesis en gel de agarosa, y las bandas correspondientes a los tamaños predichos se escindieron del gel y se recuperaron usando un Kit de Extracción en Gel QIAGEN QIAQUICK (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cada una de las cuatro versiones de los productos de PCR de TACI-Fc truncado amino terminal se clonó por separado usando el Kit de Clonación de PCR ZEROBLUNT TOPO de Invitrogen siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La Tabla 4 identifica las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de estas construcciones de TACI-Fc.

Tabla 4

Secuencias de Variantes de TACI-Fc		
Denominación de TACI-Fc	SEC ID N.º	
	Nucleótido	Aminoácido
TACI(d1-29)-Fc5	18	19
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	20	21
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	22	23
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	24	25

Después de verificar las secuencias de nucleótidos, los plásmidos que comprendían cada una de las cuatro versiones de las fusiones de TACI-Fc truncadas amino terminales se digirieron con FseI y AseI para liberar los segmentos de codificación de aminoácidos. Los fragmentos FseI - AseI se ligaron en un vector de expresión de mamífero que contenía un promotor de CMV y un segmento de SV40 poli A. Los vectores de expresión se introdujeron en células de ovario de hámster chino como se describe a continuación.

40 Ejemplo 2

Producción de proteínas TACI-Fc con células de ovario de hámster chino

Las construcciones de expresión de TACI-Fc se usaron para transfectar, a través de electroporación, células DG44 de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas en suspensión cultivadas en medio sin proteína animal (Urlaub *et al.*,

Som. Cell. Molec. Genet. 12:555 (1986)). Las células DG44 de CHO carecen de un gen de dihidrofolato reductasa funcional debido a supresiones en ambas posiciones cromosómicas de la dihidrofolato reductasa. El crecimiento de las células en presencia de aumento de concentraciones de metotrexato da como resultado la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa, y el gen codificado por proteína recombinante unido en la construcción de expresión.

5 Las células DG44 de CHO se pasaron en medios PFCHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS), L-Glutamina 4 mM (JRH Biosciences), y suplemento de hipoxantina-timidina 1x (Life Technologies), y las células se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % en matraces de agitación Corning a 120 RPM en una plataforma de agitación con rotación. Las células se transfectoron por separado con plásmidos de expresión linealizados. Para asegurar la esterilidad, se realizó una sola
10 etapa de precipitación en etanol en hielo durante 25 minutos mediante combinación de 200 µg de ADN de plásmido en un tubo Eppendorf con 20 µl de ADN vehículo de esperma de salmón cortado (5' → 3' Inc. Boulder, CO, 10 mg/ml), 22 µl de NaOAc 3 M (pH 5,2), y 484 µl de etanol al 100 % (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). Después de incubación, el tubo se centrifugó a 14.000 RPM en una micrófuga colocada en una habitación enfriada a 4 °C, el sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó dos veces con 0,5 ml de etanol al 70 % y se permitió que se
15 secara al aire.

Las células DG44 de CHO se prepararon mientras que el segmento de ADN se secaba por centrifugación de 10⁶ células totales (16,5 ml) en un tubo de centrifuga cónico de 25 ml a 900 RPM durante 5 minutos. Las células DG44 de CHO se volvieron a suspender en un volumen total de 300 µl de medio de crecimiento de PFCHO, y se colocaron
20 en una cubeta Gene-Pulser con un espacio entre electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad). El ADN, después de aproximadamente 50 minutos de tiempo de secado, se volvió a suspender en 500 µl de medio de crecimiento de PFCHO y se añadió a las células en la cubeta de modo que el volumen total no superara 800 µl y se permitió que reposa la a temperatura ambiente durante 5 minutos para disminuir la formación de burbujas. La cubeta se puso en una unidad BioRad Gene Pulser II ajustada a 0,296 kV (kilovolts) y 0,950 HC (alta capacitancia) y se electroporó
25 inmediatamente.

Las células se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente antes de su colocación en un volumen total de 20 ml de medio PFCHO en un matraz CoStar T-75. El matraz se puso a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 48 horas cuando a continuación se hizo recuento de las células con un hemocitómetro utilizando exclusión con azul de tripano y en
30 medio de selección de PFCHO sin suplemento de hipoxantina-timidina y con metotrexato 200 mM (Cal Biochem).

Tras la recuperación del proceso de selección de metotrexato, los medios acondicionados que contenían las proteínas TAC1-Fc secretadas se examinaron con análisis de Transferencia de Western.

35 Ejemplo 3

Formación de inmunofenotipos de subconjuntos de linfocitos B en sangre periférica y esplenocitos de mono
Cinomologo

40 Las poblaciones celulares se detectaron con las siguientes combinaciones de marcadores:

Sangre Completa Periférica - Parámetros evaluados

MARCADORES DE POBLACIÓN CELULAR	MARCADORES DE POBLACIÓN CELULAR
CD45FITC/CD3PerCP/CD4PE/CD8APC	CD45+/CD3+/CD4+: Linfocitos T auxiliares
CD45+/CD3+: Linfocitos T Totales	
CD45+/CD3+/CD8+: Linfocitos T citotóxicos	CD45FITC/CD3PerCP/CD40APC/CD20PE CD45+/CD3- /CD40+:
	Linfocitos B totales
CD45+/CD3-/CD40+/CD20+: Linfocitos CD20+ B	CD3PerCP/CD40FTTC/CD21APC/CD27PE
	CD3-/CD40+/CD21+/CD27-: Linfocitos B sin tratamiento previo
CD3-/CD40+/CD21+/CD27+: Linfocitos B de memoria	CD3-/CD40+/CD21-: Linfocitos CD21- B

Esplenocitos - Parámetros evaluados

MARCADORES DE POBLACIÓN CELULAR	MARCADORES DE POBLACIÓN CELULAR
CD45FITC/CD3PerCP/CD40APC/CD20PE	/CD40+: Linfocitos B totales
CD45+/CD3	
CD45+/CD3	/CD40+/CD20+: Linfocitos CD20+ B

45

Métodos

Muestras

5 La especie/cepa y fuente eran Monos Cinomolgo suministrados por el Grupo Novaprim, Mauricio. Las matrices usadas fueron sangre completa periférica (en solución de EDTA al 8 % como anticoagulante con tejido de bazo recién cosechado).

Anticuerpos Monoclonales

10 Se usaron anticuerpos monoclonales humanos disponibles en el mercado, que tienen reacción cruzada con antígenos de mono cinomolgo, como se informa en documentos pertinentes (Tabla 1, a continuación).

Procedimiento de Ensayo

15 **Sangre**

La tinción de células se realizó mediante la adición de 100 µl de sangre completa a la cantidad apropiada de cócteles de anticuerpo (Tabla 1). La mezcla de anticuerpo/sangre se mezcló de forma adecuada y a continuación se incubó durante 15-20 minutos a 4 °C. Al final del periodo de incubación, se añadió 1 ml de solución de lisado de BD FACSLyse (a dilución 1:10) y las muestras se mezclaron minuciosamente en un agitador vorticial a velocidad de baja/moderada durante varios segundos y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 minutos en la oscuridad. Al final, se añadieron 2 ml de tampón de tinción (PBS; FBS al 2 % y NaN₃ 10 mM) a esta mezcla. Los tubos se volvieron a tapar con las tapas originales, se mezclaron por inversión y a continuación se colocaron en una cubeta de balanceo y se centrifugó a 250 x g a temperatura ambiente durante 6-7 minutos. El sobrenadante se decantó y se realizó un segundo lavado. Al final de la segunda etapa de lavado, se añadieron 100 µl de tampón Cytotfix (BD) al sedimento celular y se mezcló minuciosamente en un agitador vorticial a velocidad baja/moderada. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad hasta adquisición de datos. Inmediatamente antes de la adquisición en un citómetro FACSCalibur, las muestras se volvieron a suspender en tampón de tinción.

Para tinción de inmunoglobulinas de superficie, las muestras de sangre (100 µl) se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de tinción. El sobrenadante se aspiró y se añadieron 10 µg/ml de inmunoglobulinas de conejo o cabra (respectivamente para tinción de IgD e IgM) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Al final de la etapa de bloqueo, se realizó tinción y lisado de la muestra como se ha descrito anteriormente.

Esplenocitos

40 El tejido de bazo se colocó en una placa de Petri que contenía medio frío (DMEM, FCS al 2 %, EDTA 2 mM) y se troceó cuidadosamente con un escalpelo para obtener una suspensión celular. Las células se desagregaron y se pipetearon hacia arriba y hacia abajo con una jeringa y se filtraron a través de una malla de nailon de 70 µm, se lavaron y se ajustaron a 107/ml en medio DMEM. Se añadió IgG de ratón (5-10 µg por 10⁶ células) a la suspensión celular y se incubó durante 5-10 minutos en hielo para bloquear sitios de unión no específicos.

45 A continuación, los esplenocitos se tiñeron mediante la adición de 100 µl de esplenocitos de mono cinomolgo a la cantidad apropiada de anticuerpos. La mezcla de anticuerpos/células se mezcló, y a continuación se incubó durante 15-20 minutos a 4 °C. Al final del periodo de incubación, se añadió 1 ml de solución de lisado de cloruro de amonio. Las muestras se mezclaron minuciosamente en un agitador vorticial a velocidad baja/moderada durante varios segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 7 minutos en la oscuridad. A continuación, se añadieron 2 ml de tampón de tinción (PBS; FBS al 2 %, NaN₃ 10 mM). Los tubos se volvieron a tapar con las tapas originales, se mezclaron por inversión y a continuación se colocaron en una cubeta de balanceo y se centrifugó a 250 x g durante 6-7 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el procedimiento de lavado se repitió. Al final de la segunda etapa de lavado, se añadieron 100 µl de tampón Cytotfix (BD) al sedimento celular y se mezcló minuciosamente en un agitador vorticial a velocidad baja/moderada del agitador. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad hasta adquisición de datos. Inmediatamente antes de la adquisición en un citómetro FACSCalibur, las muestras se volvieron a suspender en tampón de tinción.

Análisis de citometría de flujo

60 Para adquisición y análisis de todas las muestras se usó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado con líneas de láser de 488 nm y 633 nm y software CellQuest (BD Biosciences). Al comienzo del día, se realizaron CaliBriteBeads (BD Biosciences) para comprobar la funcionalidad del instrumento y la linealidad del detector apropiados. Se realizaron controles de compensación para confirmar el ajuste del instrumento.

65 La ventana de adquisición de linfocitos se ajustó en parámetros de dispersión directos/laterales y se verificó para incluir predominantemente linfocitos. Para cada muestra, se adquirió un mínimo de 20000 sucesos dentro de la

ventana de linfocitos.

Resultados

5 **Tinción de sangre**

Se usaron anticuerpos humanos, que tienen reacción cruzada con células de mono cinomolgo como se informa en la bibliografía (Vugmeyster Y. *et al.*, 2004, Yoshino N. *et al.*, 2000), a las concentraciones recomendadas por el fabricante (Tabla 5).

10

Tabla 5: Panel de anticuerpos de células anti-humanas

MoAb	Clon	Fuente	Cantidad
CD 45FITC	D058-1283	BD Pharmingen	20 µl
CD3PerCP	SP34-2	BD Pharmingen	20 µl
CD4PE	L-200	BD Pharmingen	20 µl
CD8APC	RPA-T8	BD Pharmingen	20 µl
CD40APC	5C3	BD Pharmingen	20 µl
CD40FITC	5C3	BD Pharmingen	20 µl
CD20PE	LH7	BD Pharmingen	20 µl
CD21APC	B-ly4	BD Pharmingen	20 µl
CD27PE	MT271	BD Pharmingen	20 µl
Anti-IgDPE de conejo policlonal	N.º de Cat 5112012	Dako Cytomation	10 µl
Anti-IgMFITC de cabra policlonal	N.º de Cat 109-096-129	Jackson ImmunoResearch	10 µl (dil. a 1:10)

Algunos anticuerpos se sometieron a ensayo de forma preliminar para comprobar la mejor dilución aplicable. Además, para comprobar la presencia de fluorescencias no específicas y para ajustar cuadrantes, para cada muestra, se realizaron combinaciones de controles de isotipo. Para todos los marcadores se obtuvieron resultados aceptables.

15

Para identificar los linfocitos B sin tratamiento previo (CD40+ CD 21+ CD27-) y de memoria (CD40+ CD21+ CD27+) era esencial usar CD27-PE conjugado, de otro modo no se podría observar la población doble positiva de CD21+ CD27+. La modificación de FITC de anticuerpos puede presentar en ocasiones anticuerpo que se une a células de mono (Reimann *et al.*, 1994). La estrategia de selección gating seguida para analizar los datos se muestra a continuación (Fig. 1). Para comprobar la calidad de la tinción, las muestras de sangre se desarrollaron previamente en el Sistema de Hematología ADVIA120 (Bayer Diagnostics), y el porcentaje de linfocitos (%) obtenidos se usó para comparación del porcentaje de selección de linfocitos.

20

25

Esplenocitos

Los anticuerpos monoclonales usados para tinción de sangre también se adoptaron para tinción de los esplenocitos. Para optimizar las concentraciones, diferentes diluciones se sometieron a ensayo inicialmente. A continuación se muestra un resumen de los anticuerpos y las concentraciones seleccionadas:

30

Tabla 6: Panel de anticuerpos de linfocitos B anti-humanos

MoAb	Clon	Fuente	Cantidad
CD 45FITC	D058-1283	BD Pharmingen	10 µl
CD3PerCP	SP34-2	BD Pharmingen	10 µl
CD40APC	5C3	BD Pharmingen	20 µl
CD40FITC	5C3	BD Pharmingen	20 µl
CD20PE	LH7	BD Pharmingen	20 µl
CD21APC	B-ly4	BD Pharmingen	20 µl
CD27PE	MT271	BD Pharmingen	20 µl

La estrategia de selección seguida para el análisis de las poblaciones celulares se expone a modo de ejemplo en las Figuras 1A, 1B, y 1C.

35

Referencias

- Vugmeyster Y., Howell K., Bakshi A., Flores C., Hwang O., McKeever K., (2004); B-cells subsets in blood and lymphoid organs in *Macaca fascicularis*, *Cytometry*, Part A 61 A: 69-75.
- 5 Yoshino N., Ami Y., Terao K., Tashiro F., Honda M., (2000); Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of *Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis)* by using anti-human cross-reactive antibodies, *Exp. Anim.* 49 (2): 97-110.
- 10 Reimann K.A., Waite B., Lee-Parritz D.E., Lin W., Uchanska-Ziegler B., O'Connell M.J., Letvin N.L., (1994); Use of human leucocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of Rhesus Monkeys, *Cytometry*, 17: 102-108.

Ejemplo 4

Combinación de Atacicept y Rituxan en Monos Cinomologos

15 La coadministración de atacicept y anticuerpo monoclonal anti-CD 20 (RITUXAN®) se sometió a ensayo en un estudio de 31 semanas en monos cinomologos.

20 El Rituximab se administró como infusión intravenosa baja (200 mg/h) a través de la vena de la cola una vez a la semana durante 4 semanas a la dosis de 20 mg/kg en un volumen de 2 ml/kg. Los grupos de control para Rituximab recibieron el vehículo para Rituximab (solución de cloruro sódico al 0,9 %).

25 El Atacicept se administró como inyecciones subcutáneas dos veces a la semana en el cuádriceps femoral (usando sitios alternos) durante 13 semanas a la dosis de 20 mg/kg en un volumen de 1 ml/kg. Los grupos de control para Atacicept recibieron el vehículo para Atacicept (PBS 1X pH 7,2).

30 Los animales se sacrificaron en diferentes puntos temporales durante el estudio para evaluación de efecto farmacológico, patología total y examen histopatológico. Un periodo de recuperación de 14 semanas siguió al periodo de tratamiento en animales seleccionados. El diseño experimental que incluye diferentes combinaciones de los dos compuestos, el número de animales por un grupo y los sacrificios programados se tabulan a continuación (Tabla 7).

35 El análisis de FACS se realizó en el bazo como se ha descrito en el Ejemplo 2 mencionado anteriormente. El análisis se realizó en bazo la Semana 5 (solamente para algunos grupos) y la Semana 18 (para todos los grupos), limitando de este modo el análisis a la Semana 18 solamente. Unidos en forma de Tabla 8 a continuación se encuentran sus datos para la Semana 18.

40 De los esplenocitos totales la Semana 18, aproximadamente un 41 % son linfocitos B CD40+ entre animales en los Grupos 1 (vehículo) y 2 (Rituximab solo). Por el contrario, solamente un 15 % de los esplenocitos son linfocitos B CD40+ después del tratamiento con atacicept (Grupo 3) en la Semana 18. Si los animales se tratan en serie con rituximab y a continuación con atacicept (Grupo 4), solamente un 6 % de los esplenocitos son linfocitos B CD40+ la Semana 18. Esta disminución de un 35 % en los animales del Grupo 4 es superior a los efectos aditivos del atacicept solo (-27 %) y rituximab solo (-1 %). Una disminución mayor que la aditiva similar se observa para los linfocitos B de memoria (% de esplenocitos CD40+ que son CD21+|CD27+).

45 Tabla 8: Formación de inmunofenotipos con citometría de flujo de linfocitos B totales (como % de linfocitos CD40+) y linfocitos B de memoria (% de esplenocitos CD40+ que son CD21+|CD27+) en el bazo.

Grupo de Ensayo	N.º de Animales	Tipo de Tratamiento		Número de Animales/Grupo (M+F) en sacrificios programados		
				Sacrificio 1 Semana (N.º de animales)	Sacrificio 2 Semana (N.º de animales)	Semana de Sacrificio de Recuperación (N.º de animales)
1	3M+3F	Semana 1-4	vehículo para rituximab	5 (1M+1F)	18 (1M+1F)	31 (1M+1F)
		Semana 5-17	vehículo para atacicept			
2	4M+4F	Semana 1-4	rituximab	5 (2M+2F)	18 (2M+2F)	-
		Semana 5-17	vehículo para atacicept			
3	4M+4F	Semana 1-4	vehículo para rituximab	-	18 (2M+2F)	31 (2M+2F)

		Semana 5-17	atacept			
4	4M+4F	Semana 1-4	rituximab	-	18 (2M+2F)	31 (2M+2F)
		Semana 5-17	atacept			
5	6M+6F	Semana 1-4	rituximab	5 (2M+2F)	14 (2M+2F)	27 (2M+2F)
		Semana 1-13	atacept			

Grupo/ Periodo de Ensayo	Linfocitos B totales (% de CD40+)	Linfocitos B de memoria (% de CD21+ CD27+)
Grupo 1/ semana 18	41,90	37,98
Grupo 2 / semana 18	41,24	28,00
Grupo 3 / semana 18	15,66	52,24
Grupo 4 / semana 18	6,33	23,70
Gp2 - Gp1	-0,66	-9,98
Gp3 - Gp1	-26,24	14,26
Aditivo	-26,90	4,28
Gp4 - Gp1	-35,57	-14,28

Conclusión

5 Los experimentos en el presente documento demostraban resultados sorprendentes porque la combinación de agentes anti-CD 20 y antagonistas de BLYS, tales como RITUXAN® y atacept, daba como resultado una supresión sinérgica de niveles de linfocitos B en comparación con el nivel de reducción con RITUXAN® y antagonistas de BLYS solos.

10 **Ejemplo 5**

Efecto del tratamiento de combinación con atacept y rituximab en ratones transgénicos CD20 humanos

15 El Rituximab no se une a CD20 de ratón y por lo tanto no se puede usar para suprimir linfocitos B en ratones normales. Además, no hay mAb de CD20 anti-ratón eficaces disponibles en el mercado para supresión de linfocitos B *in vivo*. Gong *et al.* (J. Immunol 174: 817-826; 2005) utilizaron una cepa de ratones transgénicos CD20 humanos (generados usando tecnología de cromosoma/BAC artificial bacteriano) que podrían tratar con mAb CD20 anti-humanos (rituximab y ocrelizumab) e inducir supresión de linfocitos B similar a la observada en seres humanos tratados con estos mAb. En ese papel, también mostraban que la combinación de terapia de mAb anti-CD20 con BR3-Fc (BAFFR-Ig, un inhibidor solamente de BLYS) aumentaba de forma significativa la supresión de linfocitos B esplénicos. Este ejemplo utiliza una cepa de ratones hCD20 Tg obtenida con licencia de Mark Shlomchik en la Universidad de Yale (Ahuja *et al.*, J Immunol 179: 3351-3361; 2007).

25 Enfoque general: usar dosis óptimas de cada agente terapéutico, a continuación combinada las dos en cada orden (rituximab 1º o atacept 1º) y evaluar la supresión de linfocitos B. Evaluar la supresión de linfocitos B en un punto temporal óptimo (3 semanas), pero incluir grupos adicionales para evaluar la recuperación de linfocitos B después de detener el tratamiento (~20 semanas).

30 Materiales y Métodos

Tabla 9.

Tratamiento	Concentración	Solución de dosis final (mg/ml)	Volumen/ratón (ml)	Vía	Programación
PBS	----	---	0,2	SC	M / W / F x3 semanas
hTACI-Fc5 (Atacicept) 5 mg/kg	4,61 mg/ml	1,0	0,1-0,2, dependiendo del peso corporal	SC	M / W / F x3 semanas (9 dosis/ratón)
Rituxan (Rituximab) 10 mg/kg	reserva = 10 mg/ml	10,0	0,2-0,25	IP	una vez a la semana durante 2 o 3 semanas (tres dosis semanales para los Grupos 3 y 4; dos dosis semanales para el Grupo 5)

Preparación de la Dosis

5 Solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) se dosificó a 0,2 ml por animal SC 3 veces a la semana, para imitar la programación y ruta para los grupos de tratamiento con atacicept. El atacicept se descongeló a temperatura ambiente, se mezcló suavemente pero minuciosamente, y a continuación se diluyó en PBS a temperatura ambiente para inyección SC de no más de 0,2 ml por ratón. El rituximab no se diluyó y se usó tal como se proporcionaba a 10 mg/ml.

Cuidado, Aclimatación, y Alojamiento de Animales

15 La temperatura ambiental se mantuvo a 70-74 °F (21,1-23,3 °C) y la humedad se mantuvo a un 30 %-70 %. Se usó un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, excepto cuando las luces de la habitación se encendían durante el ciclo de oscuridad para adaptar algunas actividades relacionadas con el estudio. A cada animal se le ofreció alimento para roedores (5056 irradiado, Pico Lab, Richmond, IN) y agua a voluntad. Los procedimientos usados en este estudio se diseñan para evitar o minimizar incomodidad, malestar o dolor a los animales. El tratamiento de los animales de estudio se realiza de acuerdo con condiciones especificadas en las Directrices para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación ILAR, 1996, National Academy Press). Los animales se asignaron de forma aleatoria a los diversos grupos de tratamiento como se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Asignaciones de Grupo

Grupo	Número de Animales	n
1	11, 26, 36, 51, 63, 76, 92, 109, 116, 137, 144	11
2	12, 27, 39, 52, 65, 77, 100, 110, 117, 138	10
3	18, 28, 41, 55, 72, 80, 101, 111, 123, 141	10
4	23, 32, 47, 56, 73, 82, 103, 114, 124, 142, 152	11
5	24, 35, 49, 59, 75, 89, 107, 115, 131, 143, 154	11

25 Grupos de Tratamiento: el periodo de dosificación se diseña como la fase de dosificación. El primer día de la dosificación se denomina "Día 1". El día antes del Día 1 es el "Día -1". El día siguiente al sacrificio terminal de la fase de dosificación es el primer día de la fase de recuperación.

Tabla 11. Programación del Estudio

Grupo	n	1 ^{er} Tratamiento (ruta)	2 ^o Tratamiento (ruta)	Programación de dosis	Sac Día 23	Sac Semana ~20
1	11	PBS (SC)	PBS (SC)	3 veces a la semana	5	6
2	10	Atacicept 5 mg/kg (SC)	--	3 veces a la semana durante 3 semanas (total de 9 dosis)	5	5
3	10	Rituximab 10 mg/kg (IP)	--	una vez a la semana durante 3 semanas (total de 3 dosis)	5	5
4	11	Rituximab 10 mg/kg (IP)	Atacicept 5 mg/kg (SC)	Tratamientos escalonados de 2 días; continuar ambos tratamientos durante 3 semanas	5	6

5	11	Atacept 5 mg/kg (SC)	Rituximab 10 mg/kg (IP)	Atacept durante 3 semanas (9 dosis), Rituximab durante las últimas 2 semanas de período de dosificación con atacept (2 dosis)	5	6
---	----	----------------------	-------------------------	--	---	---

El Rituximab se administró por vía intraperitoneal (IP). El Atacept y el vehículo (PBS) se administraron mediante inyección subcutánea (SC) dentro de la región subescapular tres veces a la semana (9 dosis totales). La primera dosis se administra el Día 1 (D1). En grupos de tratamiento de combinación, y cuando es relevante, todos los animales recibían la primera inyección IP, seguido de administración de la inyección SC dentro de un periodo de 60 minutos. GRUPO 4: rituximab 1º, a continuación atacept; GRUPO 5: atacept 1º, a continuación rituximab. Los volúmenes de las dosis se ajustaban semanalmente de acuerdo con los pesos corporales de los animales individuales.

10 **Resumen de Criterios de Valoración del Estudio**

- Se recogió sangre completa (150 µl; EDTA) y se realizó análisis de citometría de flujo para subconjuntos de linfocitos T y B (véase la Tabla 16).
- Se recogió suero (~100 µl de sangre completa colocada en tubos separadores de suero) a diversos puntos temporales para análisis posterior de IgG₁, IgG_{2a}, IgM, IgE e IgA total con ensayo Luminex.
- De forma simultánea, aproximadamente la mitad de los animales se sacrificaron. El resto se sacrificarán aproximadamente en la semana 20 del estudio.
- En la bolsa, se recogieron bazo y se procesaron para análisis de flujo e IHC/histología posterior. Se realizó esplenectomía con anestesia de isoflurano antes de la extracción de sangre. El bazo completo se pesó y se registró antes de seccionarlo.
- En la bolsa, los ganglios linfáticos periféricos principales (inguinales, axilares, braquiales, cervicales, y mesentéricos) se recogieron para posible IHC e histología futuras. Los ganglios linfáticos se fijaron con formalina o tampón de Zinc Tris y se almacenaron en alcohol al 70 % para un posible uso futuro.
- Para histología: 1/3 de bazo y 1 LLN (LN izquierdo) se colocaron en Zn Tris y los mismos tejidos (LN derecho) se recogieron en NBF al 10 %.

A todos los animales en los Grupos 1-5 (n = 53) se les recogió suero (100 µl de sangre en tubos separadores de suero) y sangre completa (150 µl en tubos de EDTA) el día -5 a través de la vena retro-orbital. Recogida de Suero: un mínimo de 100 µl de sangre completa se puso en tubos separadores de suero y se permitió que coagulara durante un mínimo de 15 minutos. A continuación, la sangre se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron alícuotas con un mínimo de 50 µl de suero en segundo recipiente. Las alícuotas de suero se almacenaron a ≤ 60 °C.

Sangre Completa en Recogida de EDTA: un mínimo de 150 µl de sangre se pusieron en un tubo Microtainer que contenía EDTA. Los tubos se invirtieron suavemente un mínimo de 20 veces. La sangre completa en las muestras de EDTA se almacenó a temperatura ambiente hasta que se procesara para citometría de flujo.

Todos los animales que se habían sacrificado se anestesiaron con isoflurano. A todos los animales sacrificados se les recogió sangre, suero, bazo y ganglios linfáticos periféricos principales. El bazo se recogió con anestesia de isoflurano antes de la muestra de sangre para evitar la alteración de subconjuntos de esplenocitos. El bazo completo se pesó. El bazo se corta en 3 secciones (craneal, media y caudal), para su procesamiento como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Recogida de Muestras de Bazo

Sección de bazo ¹	Medios	Uso	Almacenamiento
Craneal	Tampón de Zinc-Tris	IHC	Temperatura Ambiente
Media	RPMI + FBS al 10 %	Citometría de Flujo	4 grados Celsius
Caudal	NBF al 10 %	Histología	Temperatura Ambiente

Recogida de Ganglios Linfáticos: se recogieron los ganglios linfáticos periféricos principales (inguinales, axilares, braquiales, cervicales y mesentéricos) para histología / IHC en casetes (véase la Tabla 13).

- Los casetes que contienen Ganglios Linfáticos Izquierdos (excluyendo LN mesentérico) para IHC se colocan en tampón de Zinc Tris.
- Los casetes que contienen Ganglios Linfáticos Derechos (excluyendo LN mesentérico) para histología se colocan en NBF al 10 %.
- Los casetes que contienen Ganglios Linfáticos Mesentéricos se recogen en NBF al 10 % tomando todo el tracto intestinal (desde el estómago hasta justamente por encima del recto) completo y sin dilatar. Todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

Tabla 13. Recogida de Ganglios Linfáticos

LN ¹	Medios	Uso Potencial	Almacenamiento
LN Izquierdos	Tampón de Zinc-Tris	IHC	Temperatura Ambiente
Mesentéricos	NBF al 10 %	Histología	Temperatura Ambiente
LN Derechos	NBF al 10 %	Histología	Temperatura Ambiente

Formación de inmunofenotipos de Sangre Completa: en resumen, la sangre completa se recogió en tubos Microtainer™ de BD que contenían anticoagulante con K₂EDTA. Una alícuota de 50 µl de sangre completa se incubó con el cóctel de anticuerpos de trabajo apropiado (véase la Tabla 14) y los glóbulos rojos se sometieron a lisis. Antes de adquirir la muestra en el citómetro de flujo, se añadieron microesferas fluorescentes Flow Count™ a cada tubo de muestra para calcular las concentraciones celulares absolutas. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur de BD equipado con un láser de iones de Argón enfriado con aire de 15 mW con emisión a 488 nm y un láser de diodo rojo con emisión a 635 nm. La calibración del instrumento se realizaba cada día de adquisición de muestras y los controles apropiados se usan para verificar compensación de fluorescencia y selección de población. En la actualidad, hay dos puntos temporales más de recogida de sangre en el presente estudio.

Tabla 14. Panel de anticuerpo monoclonal de cuatro colores de sangre completa

Panel de Anticuerpos	Tipo Celular Identificado
CD45/B220/IgD/IgM	Linfocitos totales [CD45+]
	Linfocitos B totales [CD45+/B220+]
	Linfocitos B maduros [CD45+/B220+/IgD+/IgM-]
	Linfocitos B inmaduros /IgM+ [CD45+/B220+/IgD-]
	Linfocitos B sin tratamiento previo maduros [CD45+/B220+/IgD+/IgM+]
CD3/B220/CD19/huCD20	Linfocitos T totales [CD3+]
	Linfocitos B totales [CD3-/B220+]
	Linfocitos B ¹ [B220+/CD19+/huCD20-]
	Linfocitos B ² [B220+/CD19+/huCD20+]

¹ El fenotipo [B220+/CD 19+/huCD20-] describe una población de linfocitos B que expresa antígeno de superficie CD 19 tanto B220 como murino pero no el transgén CD20 humano.

² El fenotipo [B220+/CD19+/huCD20+] describe una población de linfocitos B que expresa antígeno de superficie CD 19 tanto B220 como murino incluyendo el transgén CD20 humano.

Formación de Inmunofenotipos de Bazo: en resumen, las células individuales se aislaron y se incubaron con los cócteles de anticuerpos apropiados (véase la Tabla 15). La calibración del instrumento y la adquisición de datos se realiza al igual que para la formación de inmunofenotipos de sangre completa.

Tabla 15. Panel de anticuerpo monoclonal de cuatro colores de bazo	
PANEL DE ANTICUERPO	SUBCONJUNTO DE LINFOCITOS B IDENTIFICADO
IgD/IgM/B220/hCD20	F(I) Maduro [B220+/IgM ^{bajo} /IgD+]
	F(II) Menos Maduro [B220+/IgM+/IgD+]
	F(III) Menos Maduro [B220+/IgM+/IgD ^{bajo}]
CD23/CD21/B220/CD45	MZ (zona marginal) [B220+/CD21+/CD23 ^{bajo}]
	FO (folicular) [B220+/CD21 ^{bajo} /CD23+]
	NF Recién Formado [B220+/CD21-/CD23-]
IgM/CD21/B220/CD45	M (Maduro) [B220+/IgM ^{bajo} /CD21 ^{bajo}]
	T2 (Transicional 2)/MZ [B220+/IgM+/CD21+]
	T1 (Transicional 1) [B220+/IgM+/CD21-]

20 Análisis de IHC

Tejidos: los tejidos de ensayo incluyen muestras tanto de bazo como de ganglios linfáticos. Para las muestras de bazo, se incluyen secciones transversales de bazo (piezas craneales y caudales) de cada animal. Las secciones de bazo craneales (fijadas con Zinc Tris) se tiñen con anticuerpo monoclonal de rata para CD45R/B220, CD138, o CD5 solo. Un subconjunto de secciones de tejido también se teñirá con IgG de isotipo de rata como un control negativo.

ES 2 565 202 T3

Las secciones de bazo caudales (fijadas con formalina) se tiñen con PNA biotinilado (si fuera necesario para visualizar GC; H y E puede ser suficiente) y H y E. Un subconjunto de secciones de tejido también se teñirá con proteína relacionada con hormona paratiroidea biotinilada (PTHrP) como un control negativo.

5 Los ganglios linfáticos examinados de cada animal incluyen los inguinales, axilares, braquiales, cervicales y mesentéricos. Los ganglios linfáticos se fijan con formalina o cinc Tris y se mantienen en alcohol al 70 % para su posible uso futuro.

10 Anticuerpos: los anticuerpos usados incluían tres anticuerpos monoclonales de rata para CD45R/B220 de ratón (clon RA3-6B2, isotipo: IgG2a de rata, k; 0,5 mg/ml, N.º 557390, BD Biosciences, San Jose, CA), CD5 (Ly-1, clon 53-7.3, 0,5 mg/ml, N.º 553017, BD Biosciences), y CD138 (clon Syndecan-1, 0,5 mg/ml, N.º 553712, BD Biosciences).

Análisis Estadísticos: los análisis estadísticos de diferencias de grupos en pesos de órganos, recuentos de linfocitos B y niveles de inmunoglobulinas se realizaron usando análisis de varianza (ANOVA).

15 Resultados:

La Tabla 16 expresa el cambio de porcentaje en la concentración absoluta de linfocitos B en las muestras de sangre periférica de ratón en diversos puntos temporales para el grupo de tratamiento indicado.

20

Tabla 16. Grupo/Periodo de Ensayo	Sangre periférica de B total (% de B220+)					Linfocitos B totales/huCD20+ Sangre periférica (% de B220+ CD20+)				
	Día 9	Semana 4	Semana 6	Semana 9	Semana 12	Día 9	Semana 4	Semana 6	Semana 9	Semana 12
Grupo 2 - Grupo 1	5,44	-55,47	-45,36	-7,17	-32,18	5,17	-64,04	-48,65	0,19	-33,24
Grupo 3 - Grupo 1	-65,88	-68,95	-78,17	-62,79	-52,03	-67,51	-74,09	-88,17	-83,06	-64,66
Aditivo	-60,44	-	-123,53	-69,96	-84,21	-62,34	-138,12	-136,83	-82,87	-97,90
		124,42								
Grupo 4 - Grupo 1	99,05	-98,25	-97,13	86,27	-81,10	99,04	-99,87	-99,84	98,63	-83,49
Grupo 5 - Grupo 1	24,04	-96,99	-89,96	87,96	87,77	9,07	-98,31	-94,84	97,42	-92,98

*Números en negrita/celda sombreada indican un efecto superior al aditivo para esta combinación de fármacos

La Tabla 17 es una forma alternativa de expresar los mismos datos, en forma específica, como un cambio en el porcentaje de linfocitos positivos o linfocitos B220+. Esta representación se incluye ya que esta es la forma en la que se indicaron los resultados en el experimento de mono cinomologo del Ejemplo 4 (una necesidad debido al uso de células aisladas del bazo en lugar de sangre periférica).

25

Tabla 17 Grupo/Periodo de ensayo	CD45+/B220+ (% de linfocitos) (% positivo)					B220+/huCD20+ (% de linfocitos B220+) (% positivo)				
	Día 9	Semana 4	Semana 6	Semana 9	Semana 12	Día 9	Semana 4	Semana 6	Semana 9	Semana 12
Grupo 2- Grupo 1	-2,92	-31,54	-32,50	-11,59	-11,36	-1,92	-0,21	-0,90	0,18	-0,72
Grupo 3- Grupo 1	-71,23	-63,79	-68,96	-52,80	-29,59	-25,92	-14,86	-59,65	-63,42	-15,77
Aditivo	-74,15	-95,33	-101,46	-64,39	-40,96	-24,00	-15,07	-60,55	-63,24	-16,49
Grupo 4- Grupo 1	98,32	96,40	-94,71	86,43	71,59	30,68	41,95	89,52	76,59	35,81
Grupo 5- Grupo 1	-3,02	-92,53	-82,57	79,65	74,61	1,85	33,48	67,37	84,25	54,54

*Números en negrita/celda sombreada indican un efecto superior al aditivo para esta combinación de fármacos

30

Conclusión

Los experimentos en el presente documento demostraban resultados sorprendentes porque la combinación de agentes anti-CD 20 y antagonistas de BlyS, tales como RITUXAN® y atacicept, daba como resultado una supresión sinérgica de niveles de linfocitos B en comparación con el nivel de reducción con RITUXAN® y antagonistas de BlyS solos en muchos puntos temporales.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> ZymoGenetics, Inc. Ares Trading S.A.
- <120> COMBINACIÓN DE AGENTES DE INHIBICIÓN DE BLYS Y ANTI-CD 20 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS
- 15 <130> P34961EP-D1-PCT
- <140> EP08838758.4
<141> 16-10-2008
- 20 <150> 60/980.331
<151> 16-10-2007
- <160> 41
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 1377
<212> ADN
- 30 <213> *Homo sapiens*
- <220>
<221> CDS
<222> (14)...(892)
- 35 <400> 1

ES 2 565 202 T3

agc	atc	ctg	gta	atg	agt	ggc	ctg	ggc	cgg	agc	agg	cga	ggt	ggc	cgg	49
				Met	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Gly	Gly	Arg	
				1				5							10	
agc	cgt	gtg	gac	cag	gag	gag	cgc	ttt	cca	cag	ggc	ctg	tgg	acg	ggg	97
Ser	Arg	Val	Asp	Gln	Glu	Glu	Arg	Phe	Pro	Gln	Gly	Leu	Trp	Thr	Gly	
		15					20						25			
gtg	gct	atg	aga	tcc	tgc	ccc	gaa	gag	cag	tac	tgg	gat	cct	ctg	ctg	145
Val	Ala	Met	Arg	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Gln	Tyr	Trp	Asp	Pro	Leu	Leu	
	30					35					40					
ggt	acc	tgc	atg	tcc	tgc	aaa	acc	att	tgc	aac	cat	cag	agc	cag	cgc	193
Gly	Thr	Cys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ile	Cys	Asn	His	Gln	Ser	Gln	Arg	
	45				50					55					60	
acc	tgt	gca	gcc	ttc	tgc	agg	tca	ctc	agc	tgc	cgc	aag	gag	caa	ggc	241
Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Lys	Glu	Gln	Gly	
				65					70					75		
aag	ttc	tat	gac	cat	ctc	ctg	agg	gac	tgc	atc	agc	tgt	gcc	tcc	atc	289
Lys	Phe	Tyr	Asp	His	Leu	Leu	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Ala	Ser	Ile	
			80					85					90			
tgt	gga	cag	cac	cct	aag	caa	tgt	gca	tac	ttc	tgt	gag	aac	aag	ctc	337
Cys	Gly	Gln	His	Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Tyr	Phe	Cys	Glu	Asn	Lys	Leu	

ES 2 565 202 T3

	95		100		105		
agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga							385
Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly							
110			115		120		
gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag							433
Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu							
125			130		135		140
cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt							481
His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser							
			145		150		155
gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt							529
Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys							
			160		165		170
gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag							577
Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys							
			175		180		185
agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt							625
Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser							
			195		200		
ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg							673
Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val							
			210		215		220
agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag							721
Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu							
			225		230		235
tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac							769
Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp							
			240		245		250
ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg							817
Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu							
			255		260		265
cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg							865
Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val							
			270		275		280
cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcagggaggg							912
Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala							
285			290				
aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga							972
gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga							1032
gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gaggaaaga							1092
ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga							1152
gggagagagg cagagagaca gagagggaga gaggacaga gagagataga gcaggaggtc							1212
ggggcactct gagtccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcatcacct aaccacacgt							1272
gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gccccgaga gcccctctc ctggagaata							1332
aaacctttgg cagctgcct tctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa							1377

<210> 2
 <211> 293
 <212> PRT

ES 2 565 202 T3

<213> *Homo sapiens*

<400>2

```

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1          5          10          15
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
      20          25          30
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
      35          40          45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
      50          55          60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65          70          75          80
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
      85          90          95
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
      100         105         110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
      115         120         125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
      130         135         140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
      145         150         155         160
Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
      165         170         175
Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
      180         185         190
Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
      195         200         205
Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
      210         215         220
Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
      225         230         235         240
Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
      245         250         255
Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
      260         265         270
His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
      275         280         285
Gly Gly Pro Gly Ala
      290

```

5

<210> 3

<211> 586

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (27)...(578)

15

<400>3

ES 2 565 202 T3

```

gcagcttgtg cggcggcgtc ggcacc atg agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg 53
                Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg
                1                               5

ggc agg gac gcg cca gcc ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc 101
Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe
 10                               15                               20                               25

gac ctg ctg gtc cgc cac tgc gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg ccg 149
Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro
                30                               35                               40

cgg ccg aaa ccg gcc ggg gcc agc agc cct gcg ccc agg acg gcg ctg 197
Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu
                45                               50                               55

cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg ccc 245
Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro
                60                               65                               70

ctg ccc ggg ctg ctc ttt ggc gcc ccc gcg ctg ctg ggc ctg gca ctg 293
Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu
 75                               80                               85

gtc ctg gcg ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag 341
Val Leu Ala Leu Val Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln
 90                               95                               100                               105

cgg ccg ctt cgc ggc gcg tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag 389
Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys
                110                               115                               120

gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc 437
Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile
                125                               130                               135

tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga 485
Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly
 140                               145                               150

acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc 533
Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly
 155                               160                               165

tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa 578
Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 170                               175                               180

tagcaggg 586

```

<210> 4
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 565 202 T3

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

<210> 5
 <211> 995
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (219)...(770)

10

<400>5

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggatttca aatccttacg tgccgcgaag 60
 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
 agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttcaggc 180
 tgtttcttct gtagctcct tgtttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
 Met Leu Gln Met Ala Gly
 1 5
 cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284
 Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
 10 15 20
 cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332
 Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
 25 30 35
 cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg 380
 Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala
 40 45 50
 att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt 428
 Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val

ES 2 565 202 T3

```

55              60              65              70
ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag 476
Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys
              75              80              85

gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att 524
Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile
              90              95              100

gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc 572
Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly
              105              110              115

ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc 620
Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser
              120              125              130

aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag 668
Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu
              135              140              145              150

gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag 716
Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys
              155              160              165

agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct 764
Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser
              170              175              180

gct agg taattaacca tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag 820
Ala Arg

aatagatgat gtgtcagatc tctttaggat gactgtatctt ttcagttgcc gatacagctt 880
tttgtcctct aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgtttggg 940
agcttaatgg tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga, 995

```

<210> 6
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

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

```

5

10

ES 2 565 202 T3

```

                100                105                110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
                115                120                125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
                130                135                140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145                150                155
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
                165                170                175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
                180

```

5 <210> 7
 <211> 1149
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (173)...(1023)

<400> 7

```

gaattcggca cgaggcagaa aggagaaaat tcaggataac tctcctgagg ggtgagccaa 60
gccctgccat gtagtgcacg caggacatca acaaacacag ataacaggaa atgatccatt 120
ccctgtggtc acttattcta aaggccccaa ccttcaaagt tcaagtagtg at atg gat 178
                                                Met Asp
                                                1

```

```

gac tcc aca gaa agg gag cag tca cgc ctt act tct tgc ctt aag aaa 226
Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu Lys Lys
                5                10                15

```

```

aga gaa gaa atg aaa ctg aag gag tgt gtt tcc atc ctc cca cgg aag 274
Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys
                20                25                30

```

```

gaa agc ccc tct gtc cga tcc tcc aaa gac gga aag ctg ctg gct gca 322
Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala
                35                40                45                50

```

```

acc ttg ctg ctg gca ctg ctg tct tgc tgc ctc acg gtg gtg tct ttc 370
Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe
                55                60                65

```

```

tac cag gtg gcc gcc ctg caa ggg gac ctg gcc agc ctc cgg gca gag 418
Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu
                70                75                80

```

```

ctg cag ggc cac cac gcg gag aag ctg cca gca gga gca gga gcc ccc 466
Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro
                85                90                95

```

```

aag gcc ggc ctg gag gaa gct cca gct gtc acc gcg gga ctg aaa atc 514
Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile
                100                105                110

```

ES 2 565 202 T3

ttt gaa cca cca gct cca gga gaa ggc aac tcc agt cag aac agc aga 562
 Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg
 115 120 125 130

 aat aag cgt gcc gtt cag ggt cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc 610
 Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys
 135 140 145

 ttg caa ctg att gca gac agt gaa aca cca act ata caa aaa gga tct 658
 Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser
 150 155 160

 tac aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta 706
 Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu
 165 170 175

 gaa gaa aaa gag aat aaa ata ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt 754
 Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe
 180 185 190

 atatat ggt cag gtt tta tat act gat aag acc tac gcc atg gga cat 802
 Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His
 195 200 205 210

 cta att cag agg aag aag gtc cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg 850
 Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu
 215 220 225

 gtg act ttg ttt cga tgt att caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat 898
 Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn
 230 235 240

 aat tcc tgc tat tca gct ggc att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa 946
 Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu
 245 250 255

 ctc caa ctt gca ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga 994
 Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly
 260 265 270

 gat gtc aca ttt ttt ggt gca ttg aaa ct gctgtgacct acttacacca 1043
 Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys
 275 280

 tgtctgtagc tattttcctc cctttctctg tacctctaag aagaagaat ctaactgaaa 1103
 ataccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctctgagcg gccgcc 1149

<210> 8
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30

5

10

ES 2 565 202 T3

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95
 Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110
 Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140
 Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160
 Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175
 Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190
 Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205
 Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220
 Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 245 250 255
 Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
 260 265 270
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys
 275 280

<210> 9
 <211> 1680
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (164)...(1093)

10

<400>9

tactcactat agggctcgag cggccgcccg ggcaggtgct cctgggggaa cccagccctg 60
 ccattgctctg agggcagtct cccaggacac agatgacagg aatgaccca cccctgtggt 120
 cacttactcc aaaggcctag acctcaaag tgctcctcgt gga atg gat gag tct 175
 Met Asp Glu Ser
 1

gca aag acc ctg cca cca ccg tgc ctc tgt ttt tgc tcc gag aaa gga 223
 Ala Lys Thr Leu Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys Ser Glu Lys Gly
 5 10 15 20

gaa gat atg aaa gtg gga tat gat ccc atc act ccg cag aag gag gag 271
 Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro Gln Lys Glu Glu
 25 30 35

ES 2 565 202 T3

ggt gcc tgg ttt ggg atc tgc agg gat gga agg ctg ctg gct gct acc	319
Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ala Thr	
40 45 50	
ctc ctg ctg gcc ctg ttg tcc agc agt ttc aca gcg atg tcc ttg tac	367
Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala Met Ser Leu Tyr	
55 60 65	
cag ttg gct gcc ttg caa gca gac ctg atg aac ctg cgc atg gag ctg	415
Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu Arg Met Glu Leu	
70 75 80	
cag agc tac cga ggt tca gca aca cca gcc gcc gcg ggt gct cca gag	463
Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Ala Pro Glu	
85 90 95 100	
ttg acc gct gga gtc aaa ctc ctg aca ccg gca gct cct cga ccc cac	511
Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala Pro Arg Pro His	
105 110 115	
aac tcc agc cgc ggc cac agg aac aga cgc gct ttc cag gga cca gag	559
Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu	
120 125 130	
gaa aca gaa caa gat gta gac ctc tca gct cct cct gca cca tgc ctg	607
Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Pro Cys Leu	
135 140 145	
cct gga tgc cgc cat tct caa cat gat gat aat gga atg aac ctc aga	655
Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly Met Asn Leu Arg	
150 155 160	
aac atc att caa gac tgt ctg cag ctg att gca gac agc gac acg ccg	703
Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asp Thr Pro	
165 170 175 180	
act ata cga aaa gga act tac aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt	751
Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe	
185 190 195	
aaa aga gga aat gcc ttg gag gag aaa gag aac aaa ata gtg gtg agg	799
Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg	
200 205 210	
caa aca ggc tat ttc ttc atc tac agc cag gtt cta tac acg gac ccc	847
Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro	
215 220 225	
atc ttt gct atg ggt cat gtc atc cag agg aag aaa gta cac gtc ttt	895
Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe	
230 235 240	
ggg gac gag ctg agc ctg gtg acc ctg ttc cga tgt att cag aat atg	943
Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met	
245 250 255 260	

ES 2 565 202 T3

ccc aaa aca ctg ccc aac aat tcc tgc tac tcg gct ggc atc gcg agg 991
 Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Arg
 265 270 275

ctg gaa gaa gga gat gag att cag ctt gca att cct cgg gag aat gca 1039
 Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala
 280 285 290

cag att tca cgc aac gga gac gac acc ttc ttt ggt gcc cta aaa ctg 1087
 Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu
 295 300 305

ctg taa ctcacttgct ggagtgcgtg atccccctcc ctcgtcttct ctgtacctcc 1143
 Leu *

gagggagaaa cagacgactg gaaaaactaa aagatgggga aagccgctcag cgaaagtttt 1203
 ctcgtgacct gttgaatctg atccaaacca ggaaatataa cagacagcca caaccgaagt 1263
 gtgccatgtg agttatgaga aacggagccc gcgctcagaa agaccggatg aggaagaccg 1323
 ttttctccag tcctttgccca acacgcaccg caaccttgct ttttgccttg ggtgacacat 1383
 gttcagaatg cagggagatt tccttgtttt gcgatttgcc atgagaagag ggcccacaac 1443
 tgcagggtcac tgaagcattc acgctaagtc tcaggattta ctctcccttc tcatgctaag 1503
 tacacacacg ctcttttcca ggtaatacta tgggatacta tggaaagggt gtttgttttt 1563
 aaatctagaa gtcttgaact ggcaatagac aaaaatcctt ataaattcaa gtgtaaaata 1623
 aacttaatta aaaaggtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1680

<210> 10
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 10

5

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

10

ES 2 565 202 T3

```

                195                200                205
Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu
  210                215                220
Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys
225                230                235                240
Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys
                245                250                255
Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala
                260                265                270
Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro
                275                280                285
Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly
290                295                300
Ala Leu Lys Leu Leu
305

```

5 <210> 11
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

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

```

10 <210> 12
 <211> 247
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

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

```

ES 2 565 202 T3

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

5 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptidos de unión a BLYS
 <400> 13

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Lys

15 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptidos de unión a BLYS
 <400> 14

25 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Pro Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptidos de unión a BlyS

 10 <400> 15

 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
 1 5 10 15
 Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptidos de unión a BlyS

 20 <400> 16

 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
 1 5 10 15
 Arg

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptidos de unión a BlyS

 30 <400> 17

 Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 1214
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (17)...(1192)

50 <400> 18

ES 2 565 202 T3

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
1 5 10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
15 20 25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
30 35 40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
45 50 55 60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
65 70 75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
80 85 90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
95 100 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc 388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
110 115 120

agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga 436
Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly
125 130 135 140

agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc 484
Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu
145 150 155

cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca 532
Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
160 165 170

ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc 580
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
175 180 185

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc 628
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
190 195 200

ES 2 565 202 T3

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc 676
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 205 210 215 220

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg 724
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 225 230 235

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc 772
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 240 245 250

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc 820
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 255 260 265

tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc 868
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 270 275 280

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg 916
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 285 290 295 300

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc 964
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg 1012
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 320 325 330

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc 1060
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 335 340 345

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 1108
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 350 355 360

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 1156
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 365 370 375 380

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag 1202
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

gcgcgccaat ta 1214

<210> 19
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

<400> 19

5

10

ES 2 565 202 T3

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 55 60
 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85 90 95
 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110
 Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg
 115 120 125
 Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys
 145 150 155 160
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 165 170 175
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 180 185 190
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 195 200 205
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 210 215 220
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 225 230 235 240
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 245 250 255
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 260 265 270
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 275 280 285
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 290 295 300
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 325 330 335
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 355 360 365
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 370 375 380
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

<210> 20

<211> 1070

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión a TACI-Fc

10

<220>

ES 2 565 202 T3

<221> CDS
 <222> (17)...(1048)

<400> 20

5

```

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
      Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
              1              5              10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tgg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
              15              20              25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
              30              35              40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
              45              50              55              60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
              65              70              75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
              80              85              90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
              95              100              105

ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca 388
Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
              110              115              120

ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc 436
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
              125              130              135              140

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc 484
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
              145              150              155

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc 532
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
              160              165              170

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg 580
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
    
```

ES 2 565 202 T3

	175		180		185															
	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc				628
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr				
	190					195						200								
	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc				676
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val				
	205					210					215					220				
	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc				724
	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala				
					225					230					235					
	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg				772
	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg				
				240					245					250						
	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc				820
	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly				
			255					260					265							
	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg				868
	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro				
	270					275						280								
	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc				916
	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser				
	285					290					295				300					
	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag				964
	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln				
					305					310					315					
	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac				1012
	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His				
				320					325					330						
	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	taatctagag							1058
	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
			335					340												
	gcgcgccaat ta															1070				

5
 <210> 21
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

<400> 21

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg
			20					25					30		

ES 2 565 202 T3

Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35 40 45
 Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50 55 60
 Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65 70 75 80
 Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85 90 95
 Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
 100 105 110
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 22
 <211> 1082
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

10

<220>
 <221 > CDS
 <222> (17)...(1060)

15

<400> 22

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu

ES 2 565 202 T3

		1			5			10								
ctg	ctg	tgt	ggc	gcc	gtc	ttc	gtt	tcg	ctc	agc	cag	gaa	atc	cat	gcc	100
Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	
		15					20					25				
gag	ttg	aga	cgc	ttc	cgt	aga	gct	atg	aga	tcc	tgc	ccc	gaa	gag	cag	148
Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Arg	Arg	Ala	Met	Arg	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Gln	
	30					35					40					
tac	tgg	gat	cct	ctg	ctg	ggt	acc	tgc	atg	tcc	tgc	aaa	acc	att	tgc	196
Tyr	Trp	Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	Thr	Cys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ile	Cys	
45					50					55					60	
aac	cat	cag	agc	cag	cgc	acc	tgt	gca	gcc	ttc	tgc	agg	tca	ctc	agc	244
Asn	His	Gln	Ser	Gln	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	
				65				70						75		
tgc	cgc	aag	gag	caa	ggc	aag	ttc	tat	gac	cat	ctc	ctg	agg	gac	tgc	292
Cys	Arg	Lys	Glu	Gln	Gly	Lys	Phe	Tyr	Asp	His	Leu	Leu	Arg	Asp	Cys	
			80					85					90			
atc	agc	tgt	gcc	tcc	atc	tgt	gga	cag	cac	cct	aag	caa	tgt	gca	tac	340
Ile	Ser	Cys	Ala	Ser	Ile	Cys	Gly	Gln	His	Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Tyr	
		95				100						105				
ttc	tgt	gag	aac	aag	ctc	agg	agc	gag	ccc	aaa	tct	tca	gac	aaa	act	388
Phe	Cys	Glu	Asn	Lys	Leu	Arg	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	
	110					115					120					
cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	436
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	
125					130					135					140	
gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	484
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				145					150					155		
acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	532
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			160					165					170			
gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	580
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		175					180					185				
aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	628
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	190					195					200					
agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	676
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
205					210					215					220	
aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	724
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	
				225					230					235		

ES 2 565 202 T3

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg 772
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 240 245 250

ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc 820
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 255 260 265

ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc 868
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 270 275 280

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac 916
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 285 290 295 300

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc 964
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305 310 315

agggtgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 1012
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 320 325 330

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1060
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 335 340 345

taatctagag gcgcgccaat ta 1082

<210> 23
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

<400> 23

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

ES 2 565 202 T3

```

      130                135                140
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
145                150                155                160
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
      165                170                175
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
      180                185                190
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
      195                200                205
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
      210                215                220
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
225                230                235                240
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
      245                250                255
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
      260                265                270
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
      275                280                285
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
      290                295                300
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
305                310                315                320
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      325                330                335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      340                345

```

5 <210> 24
 <211> 1109
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

<220>
 <221> CDS
 <222> (17)...(1090)

15 <400> 24

```

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
      Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
      1                5                10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
      15                20                25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
      30                35                40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
      45                50                55                60

```

ES 2 565 202 T3

aac	cat	cag	agc	cag	cgc	acc	tgt	gca	gcc	ttc	tgc	agg	tca	ctc	agc	244
Asn	His	Gln	Ser	Gln	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	
				65					70					75		
tgc	cgc	aag	gag	caa	ggc	aag	ttc	tat	gac	cat	ctc	ctg	agg	gac	tgc	292
Cys	Arg	Lys	Glu	Gln	Gly	Lys	Phe	Tyr	Asp	His	Leu	Leu	Arg	Asp	Cys	
			80					85					90			
atc	agc	tgt	gcc	tcc	atc	tgt	gga	cag	cac	cct	aag	caa	tgt	gca	tac	340
Ile	Ser	Cys	Ala	Ser	Ile	Cys	Gly	Gln	His	Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Tyr	
		95					100					105				
ttc	tgt	gag	aac	aag	ctc	agg	agc	cca	gtg	aac	ctt	cca	cca	gag	ctc	388
Phe	Cys	Glu	Asn	Lys	Leu	Arg	Ser	Pro	Val	Asn	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	
	110					115					120					
agg	gag	ccc	aaa	tct	tca	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	436
Arg	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
125					130					135					140	
gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	484
Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				145					150					155		
ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	532
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			160					165						170		
gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	580
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		175					180					185				
gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	628
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	190					195					200					
cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	676
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
205					210					215					220	
cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	724
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				225					230					235		
gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	772
Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			240					245						250		
ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	820
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		255					260					265				
acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	868
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	270					275					280					

ES 2 565 202 T3

```

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 916
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
285                290                295                300

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 964
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                305                310                315

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1012
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                320                325                330

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1060
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                335                340                345

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta 1109
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
                350                355

```

<210> 25
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión a TACI-Fc

<400> 25

```

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

```

ES 2 565 202 T3

210						215						220					
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser		
225					230					235					240		
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
				245					250					255			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln		
			260					265					270				
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
	275						280					285					
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr		
290					295					300							
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu		
305					310					315							
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
			325						330					335			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
			340					345						350			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys													
		355															

<210> 26
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión a BAFF-R-Fc

10

<400> 26

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

ES 2 565 202 T3

	210		215		220														
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp			
	225					230					235					240			
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys			
					245					250					255				
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser			
					260					265					270				
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser			
					275					280					285				
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
										295					300				
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
	305					310													

5 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia cebadora

<400> 27
 tattaggccg gccacatgg atgcaatga 29

15 <210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia cebadora

<400> 28
 tgaagatttg ggctccttga gacctggga 29

25 <210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia cebadora

35 <400> 29
 tcccaggctc caaggagccc aaatctca 29

40 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia cebadora

45 <400> 30
 taattggcgc gcctctagat tatttaccg gagaca36

<210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 31
 5 tgaagattg ggctcgttct cacagaagta 30

 <210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 32
 15 atacttctgt gagaacgagc ccaaatttc a 31

 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 33
 25 ttgggctcg ctctgagct tgttctaca 30

 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 34
 35 ctcaggagcg agcccaaadc ttcagaca 28

 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 35
 45 ttgggctcc ctgagctctg gtggaa 26

 <210> 36
 <211> 28
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia cebadora

 <400> 36
 55 gagctcagg agcccaaadc ttcagaca 28

 <210> 37
 <211> 1216
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 565 202 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (141)...(890)

5 <400> 37

```

gaattoggct cgagcctttt tatttctcct tgcgtaacaa ctttcttccc ttctgcacca 60
ctgcccgtac ccttaccogc cccgccacct ccttgctacc ccactcttga aaccacagct 120
gttggcaggg tccccagctc atg cca gcc tca tct cct ttc ttg cta gcc ccc 173
                Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro
                   1             5             10

aaa ggg cct cca ggc aac atg ggg ggc cca gtc aga gag ccg gca ctc 221
Lys Gly Pro Pro Gly Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu
                15             20             25

tca gtt gcc ctc tgg ttg agt tgg ggg gca gct ctg ggg gcc gtg gct 269
Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala
                30             35             40

tgt gcc atg gct ctg ctg acc caa caa aca gag ctg cag agc ctc agg 317
Cys Ala Met Ala Leu Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg
                45             50             55

aga gag gtg agc cgg ctg cag ggg aca gga ggc ccc tcc cag aat ggg 365
Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly
                60             65             70             75

gaa ggg tat ccc tgg cag agt ctc ccg gag cag agt tcc gat gcc ctg 413
Glu Gly Tyr Pro Trp Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu
                80             85             90

gaa gcc tgg gag aat ggg gag aga tcc cgg aaa agg aga gca gtg ctc 461
Glu Ala Trp Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu
                95             100             105

acc caa aaa cag aag aag cag cac tct gtc ctg cac ctg gtt ccc att 509
Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile
                110             115             120

aac gcc acc tcc aag gat gac tcc gat gtg aca gag gtg atg tgg caa 557
Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln
    
```

ES 2 565 202 T3

125	130	135	
cca gct ctt agg cgt ggg aga ggc cta cag gcc caa gga tat ggt gtc			605
Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val			
140	145	150	155
cga atc cag gat gct gga gtt tat ctg ctg tat agc cag gtc ctg ttt			653
Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe			
	160	165	170
caa gac gtg act ttc acc atg ggt cag gtg gtg tct cga gaa ggc caa			701
Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln			
	175	180	185
gga agg cag gag act cta ttc cga tgt ata aga agt atg ccc tcc cac			749
Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His			
	190	195	200
ccg gac cgg gcc tac aac agc tgc tat agc gca ggt gtc ttc cat tta			797
Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu			
	205	210	215
cac caa ggg gat att ctg agt gtc ata att ccc cgg gca agg gcg aaa			845
His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys			
	225	230	235
ctt aac ctc tct cca cat gga acc ttc ctg ggg ttt gtg aaa ctg			890
Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu			
	240	245	250
tgattgtgtt ataaaaagtg gctcccagct tggaagacca ggggtgggtac atactggaga			950
cagccaagag ctgagtatat aaaggagagg gaatgtgcag gaacagaggc gtcttcctgg			1010
gtttggtccc ccgttctca cttttccctt ttcattccca ccccctagac tttgatttta			1070
cggatatctt gcttctgttc cccatggagc tccgaattct tgcgtgtgtg tagatgaggg			1130
gcgggggacg ggcgccaggc attgttcaga cctggtcggg gcccactgga agcatccaga			1190
acagcaccac catctagcgg ccgccc			1216

<210> 38
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

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

10

ES 2 565 202 T3

```

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
      115                      120                      125
Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
      130                      135                      140
Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
      145                      150                      155                      160
Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
      165                      170                      175
Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
      180                      185                      190
Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
      195                      200                      205
Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
      210                      215                      220
Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
      225                      230                      235                      240
His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
      245                      250

```

5 <210> 39
 <211> 762
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (7)...(759)

<400> 39

```

ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc      48
      Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
          1          5          10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc      96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      15          20          25          30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc      144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
          35          40          45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag      192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
          50          55          60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag      240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
          65          70          75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag      288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
          80          85          90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc      336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
          95          100          105          110

```

ES 2 565 202 T3

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 384
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 115 120 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa 432
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 130 135 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 480
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 145 150 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 528
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 160 165 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 576
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175 180 185 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 624
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 195 200 205

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 672
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 210 215 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 720
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 225 230 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 762
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 240 245 250

<210> 40
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40

5

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

10

ES 2 565 202 T3

				100					105					110			
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
			115				120					125					
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		
	130					135					140						
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp		
145					150					155					160		
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
				165					170					175			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
			180					185					190				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
		195				200						205					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
	210					215					220						
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
225					230					235					240		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				245					250								

- <210> 41
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Líder tPA optimizado

- <400> 41

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg
			20					25					30		
Phe	Arg	Arg													
		35													

REIVINDICACIONES

1. Un dominio extracelular de un polipéptido de activador transmembrana y modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina (TACI) que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20, para uso en la reducción de los números de linfocitos B en un mamífero.
2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un dominio extracelular de un polipéptido de activador transmembrana y modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina (TACI) que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD 20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20, para uso en el alivio de un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B en un paciente.
3. Un polipéptido TACI que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el trastorno autoinmunitario se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus (LN), enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynauld, síndrome de Sjörgen y glomerulonefritis.
4. Un polipéptido TACI que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el trastorno autoinmunitario es lupus eritematoso sistémico (LES).
5. Un polipéptido TACI que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido TACI es para administración a una dosificación de 1 a 25 mg/kg y el agente anti-CD20 es para administración a una dosificación de 1 a 25 mg/kg.
6. Un polipéptido TACI que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y un agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polipéptido TACI es para administración a una dosificación de aproximadamente 20 mg/kg y el agente anti-CD20 es para administración a una dosificación de aproximadamente 20 mg/kg.
7. Un polipéptido TACI que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada y el agente anti-CD-20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 junto con una terapia que usa un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo que consiste en ciclofosfamida (CYC), azatioprina (AZA), ciclosporina A (CSA), micofenolato mofetilo (MMF), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides, prednisona y fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedades (DMARD).
8. Un artículo de fabricación que comprende:
- una cantidad terapéuticamente eficaz de un dominio extracelular de un polipéptido de activador transmembrana y modulador de calcio e interactor de ligando de ciclofilina (TACI) que comprende una forma secretada de la SEC ID N°: 23 que tiene la secuencia señal de activación de plasminógeno tisular modificada (SEC ID N°: 41) retirada, y un agente anti-CD20 que comprende un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz da como resultado una reducción sinérgica en el número de linfocitos B de memoria;
- y
- una etiqueta, en donde la etiqueta indica que la composición es para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario regulado por linfocitos B.

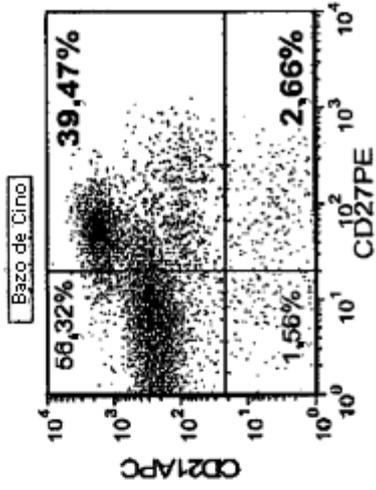
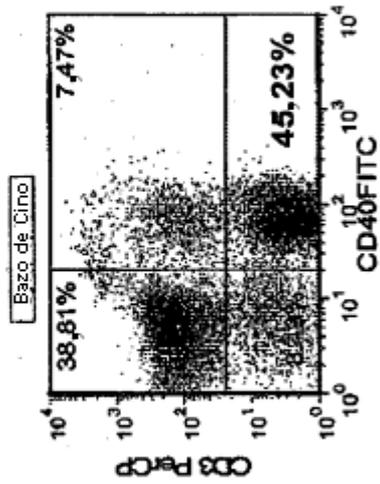
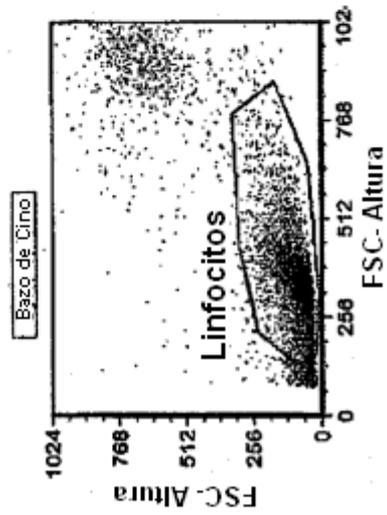


Figura 1A

Figura 1B

Figura 1C

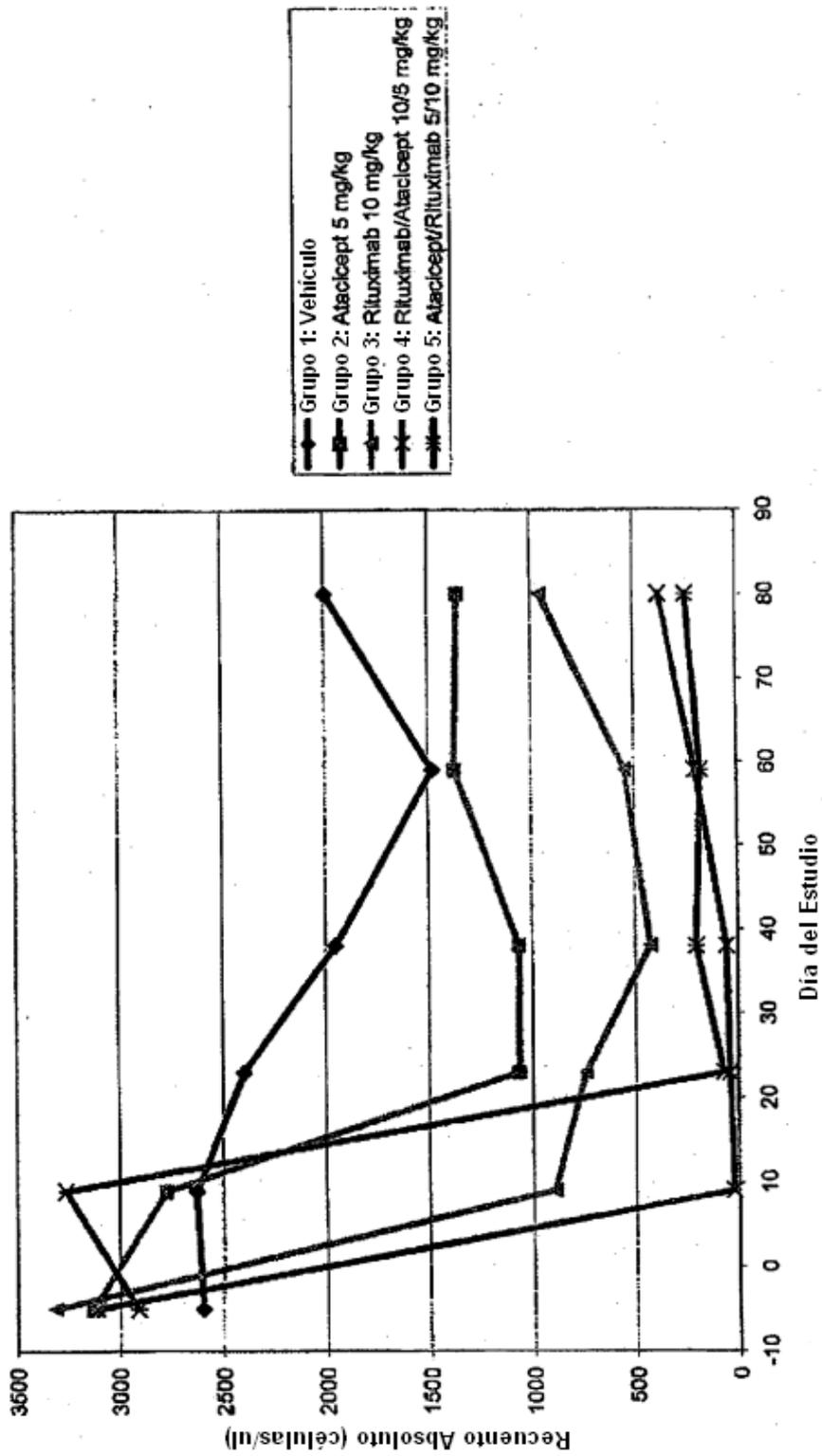


FIGURA 2

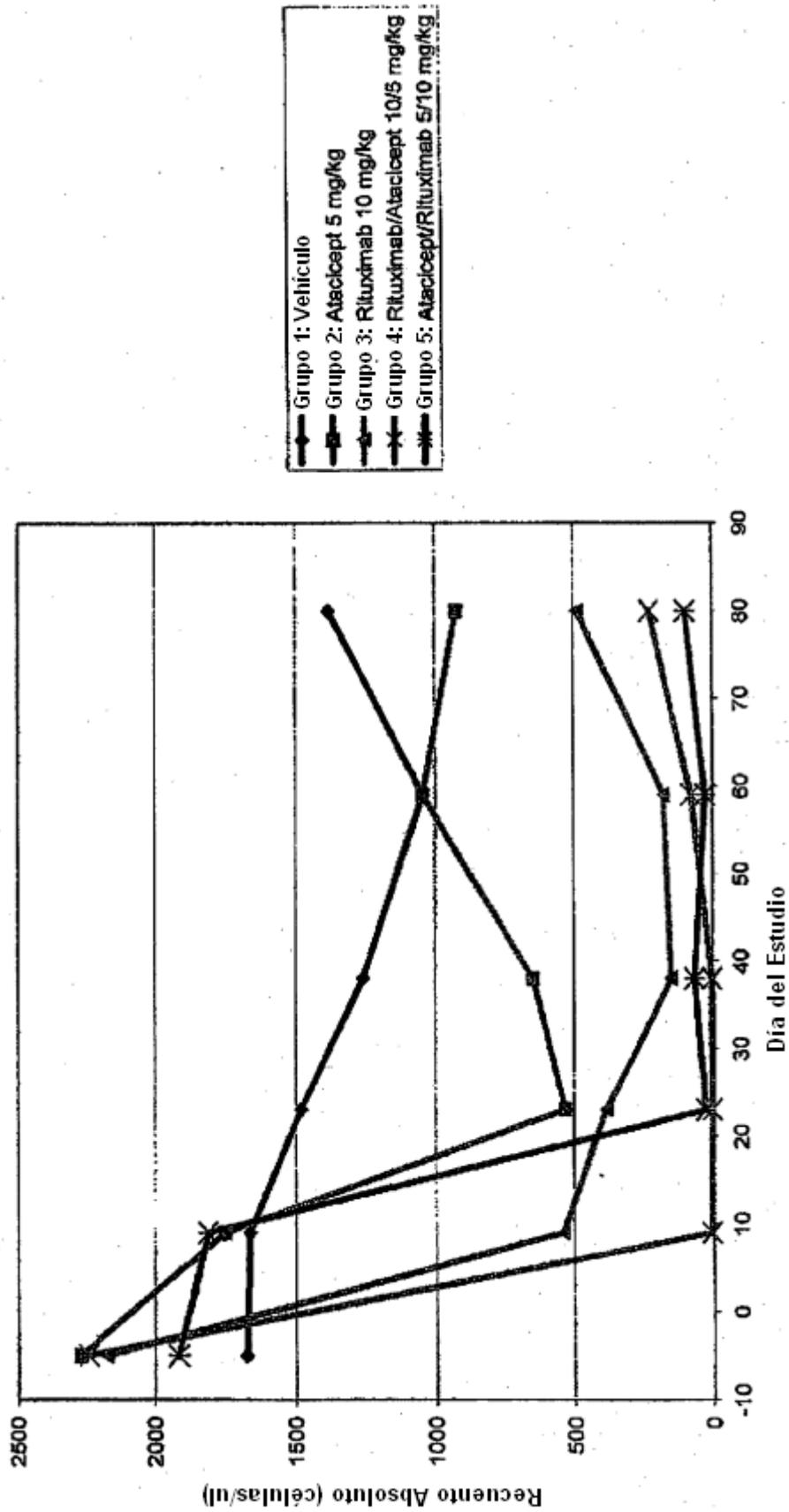


FIGURA 3

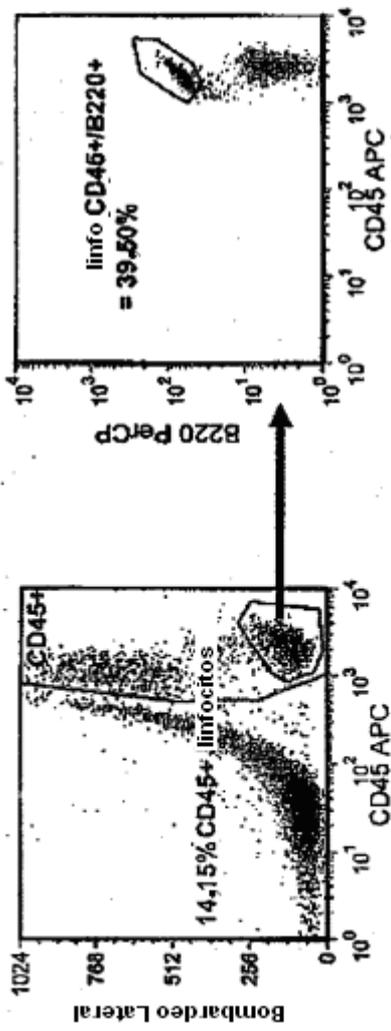


FIGURA 4B

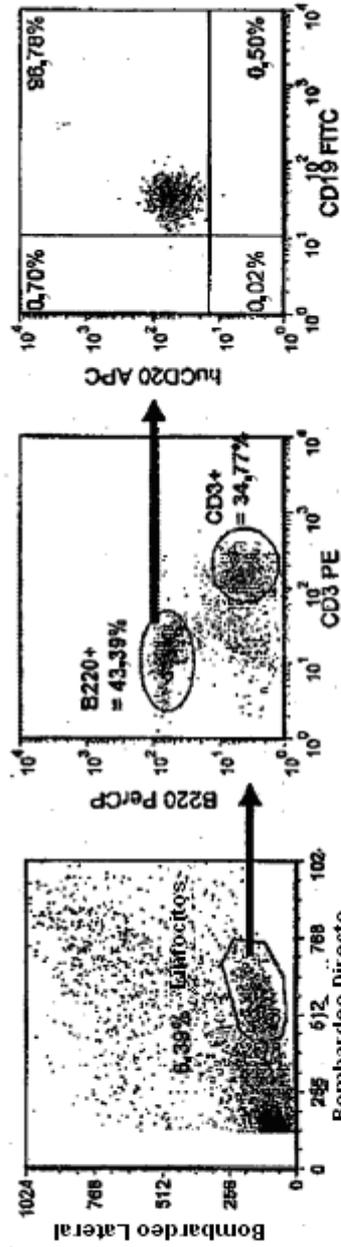


FIGURA 4E

FIGURA 4D

FIGURA 4C