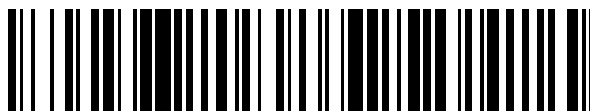


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 404**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010 E 10706979 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2403528**

54 Título: **Anticuerpos contra un ligando inductor de proliferación (APRIL)**

30 Prioridad:

**02.03.2009 EP 09154079**

**09.04.2009 EP 09157722**

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

**07.06.2016**

73 Titular/es:

**ADURO BIOTECH HOLDINGS, EUROPE B.V.  
(100.0%)  
Kloosterstraat 9, RX1101  
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**MEDEMA, JAN, PAUL;  
EENENNAAM, VAN, HANS;  
GUADAGNOLI, MARCO;  
KIMBERLEY, FIONA, CLARE y  
PHAN, UYEN, TRUONG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 573 404 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra un ligando inductor de proliferación (APRIL)

5 La presente invención se refiere a anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen con APRIL humano, a polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos y a células hospedadoras que producen dichos anticuerpos. Los anticuerpos pueden usarse para inhibir la proliferación y/o supervivencia de células inmunitarias, para tratar el cáncer y para tratar una enfermedad inflamatoria.

10 APRIL se expresa como una proteína transmembrana de tipo II, pero a diferencia de la mayoría de los otros miembros de la familia de TNF se procesa principalmente como una proteína secretada y se escinde en el aparato de Golgi donde una furina convertasa lo escinde para liberar una forma activa soluble (Lopez-Fraga *et al.*, 2001, EMBO Rep 2, 945-51). APRIL se ensambla como un homotrímero ligado de forma no covalente con homología estructural similar en el plegamiento proteico a varios otros ligandos de la familia de TNF (Wallweber *et al.*, 2004, Mol Biol 343, 283-90). APRIL se une con dos receptores de TNF: antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) y activador transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando de ciclofilina (TACI) (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol. 218(1): 1-8). Además, se ha mostrado recientemente que APRIL se une con proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Hendriks *et al.*, 2005, Cell Death Differ 12, 637-48).

20 APRIL muestra alta homología (30 %) con otro miembro de la superfamilia del TNF, factor activador de linfocitos B que pertenece a la familia de TNF (BAFF o estimulador de linfocitos B, BLyS), con el que comparte unión con sus receptores, BCMA y TACI. También se sabe que BAFF se une con un único receptor, receptor de BAFF, y a través de este media en señales de supervivencia cruciales durante el desarrollo de linfocitos B (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8). Se ha sugerido que APRIL y BAFF forman trímeros mixtos (Roschke *et al.*, 2002, J Immunol. 169(8): 4314-21). Se ha descubierto que dichos trímeros mixtos aparecen con mayor prevalencia en pacientes con artritis reumatoide (AR).

30 APRIL se expresa predominantemente por subconjuntos de células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B y linfocitos T, muchos de los cuales también expresan BAFF. Además, APRIL puede expresarse por células no inmunitarias tales como osteoclastos, células epiteliales y una diversidad de tejidos tumorales (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol 218 (1): 1-8).

35 La función de APRIL se estableció usando modelos genéticos de ratón. Los ratones transgénicos para hAPRIL se desarrollan con normalidad, pero mostraron supervivencia de linfocitos T potenciada y niveles elevados de anticuerpos IgM (Stein *et al.*, 2002, J Clin Invest 109, 1587-98). Además, se potenciaron respuestas de tipo II independientes de linfocitos T. Los ratones transgénicos hAPRIL envejecidos presentaron agrandamiento extremo y reorganización del sistema linfático y bazo agrandado debido a infiltración de linfocitos B positivos para CD5, un fenotipo que se asemeja estrechamente a B-CLL humano (Planelles *et al.*, 2004, Cancer Cell 6, 399-408). Se descubrió que los ratones deficientes en APRIL tenían niveles reducidos de IgA en circulación y tras la exposición a un antígeno dependiente de linfocitos T (Castigli *et al.*, 2004, Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3903-8; Varfolomeev *et al.*, 2004, Mol Cell Biol 24, 997-1006). A continuación, se demostró que APRIL, junto con BAFF, actuaba en la recombinación de cambio de clase (CSR) de anticuerpos tanto para IgG como para IgA, independientemente de la señalización de CD40-CD40L (Litinskiy *et al.*, 2002, Nat Immunol 3, 822-9). Además, se demostró que APRIL era menos crítico que BAFF en el mantenimiento de linfocitos B, pero se mostró que tenía un papel en la señalización de linfocitos B y conducía tanto la proliferación como la supervivencia de linfocitos B humanos y murinos *in vitro* (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol. 218(1): 1-8).

50 APRIL se identificó originalmente basándose en su expresión en células cancerosas (Hahne *et al.*, 1998, J Exp Med 188, 1185-90). Se descubrieron altos niveles de expresión de ARNm de APRIL en un panel de líneas celulares tumorales así como tumores primarios humanos tales como colon, y un carcinoma linfoide. Además, se mostró que células NIH-3T3 de fibroblasto murino transfectadas con APRIL crecían más rápidamente en ratones inmunodeficientes. Resulta más importante que se mostró que el bloqueo de APRIL usando un receptor de APRIL soluble inhibía el crecimiento tumoral de carcinomas de pulmón y de colon (Rennert *et al.*, 2000, J Exp Med 192, 1677-84).

55 Los linfocitos B de leucemia linfocítica crónica (CLL) expresan tanto APRIL como receptores de APRIL. Además, se ha mostrado que APRIL protegía contra células CLL contra apoptosis espontánea e inducida por fármacos y activación de NF- $\kappa$ B estimulada (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol. 218(1): 1-8). Un estudio retrospectivo con 95 pacientes de CLL mostró niveles aumentados de APRIL en suero, que se correlacionaban con progresión de enfermedad y supervivencia general de los pacientes, con un pronóstico peor para pacientes con altos niveles de APRIL en suero (Planelles *et al.*, 2007, Haematologica 92, 1284-5).

65 De forma similar, se ha mostrado que (niveles aumentados de) APRIL se expresaban en linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (NHL) y mieloma múltiple (MM) (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell Physiol. 218(1): 1-8). Un estudio retrospectivo en pacientes con DLBCL (NHL) mostró que la alta expresión de APRIL en lesiones cancerosas se correlacionaba con una mala tasa de supervivencia (Schwaller *et al.*, 2007, Blood 109, 331-8). Usando líneas celulares de NHL y MM se ha mostrado que el tratamiento con APRIL o BAFF aumentaba la supervivencia mediante activación de NF- $\kappa$ B y regulación positiva de proteínas prosupervivencia (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, J Cell

Physiol. 218(1): 1-8). De acuerdo con este papel pro-supervivencia de APRIL, se ha mostrado que las células MM experimentaban apoptosis cuando se cultivaban en presencia de TACI-Fc. Ya que el receptor de BAFF era menos eficaz en la potenciación de la apoptosis, esto indica que APRIL, y no BAFF es principalmente responsable de la supervivencia potenciada en estas células (Abe *et al.*, 2006, *Leukemia* 20, 1313-5).

5 También se descubrió que APRIL se sobreexpresaba en varias líneas celulares derivadas de tumores sólidos. De hecho, APRIL fue capaz de estimular la proliferación *in vitro* de varias de estas líneas celulares (revisado en Kimberley *et al.*, 2009, *J Cell Physiol.* 218(1): 1-8).

10 Debido a su papel en la biología de linfocitos B APRIL también desempeña un papel en muchas enfermedades autoinmunitarias. De hecho, atacicept (una preparación de TACI-Fc comercial) ya está en numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias (revisado en Gatto *et al.*, 2008, *Curr Opin Investig Drugs.* 9(11): 1216-27). Se han presentado niveles en suero aumentados de APRIL y BAFF en muchos pacientes con SLE (Koyama *et al.*, 2005, *Ann Rheum Dis* 64, 1065-7). Un análisis retrospectivo reveló que los niveles en suero de APRIL tendían a correlacionarse con títulos de anticuerpos anti-ADNbc. Se obtuvieron pruebas de que APRIL puede desempeñar un papel funcional en SLE ensayando el efecto de la proteína de fusión de TACI-Fc en ratones propensos al lupus (Gross *et al.*, 2000, *Nature* 404, 995-9), lo que evitaba el desarrollo de enfermedad y prolongaba la supervivencia.

20 Además, también se descubrió que la inhibición de APRIL y BAFF con TACI-Fc en el modelo de ratón CIA de artritis reumatoide prevenía la progresión de enfermedad y reducía las puntuaciones de enfermedad, en comparación con los controles (Gross *et al.*, 2001, *Immunity* 15, 289-302; Wang *et al.*, 2001, *Nat Immunol* 2, 632-7). Además en otro modelo de artritis, quimeras de ratón de sinovio-SCID, TACI-Fc mostró un efecto beneficioso (Seyler *et al.*, 2005, *J Clin Invest* 115, 3083-92). El tratamiento con TACI-Fc dio como resultado la desaparición de centros germinales en el tejido sinovial, reducción de la producción de Ig y reducción de la producción de IFN-gamma.

25 Se ha indicado posteriormente que el líquido sinovial de pacientes con artritis inflamatoria tenía niveles de APRIL significativamente aumentados en comparación con los pacientes que padecían artritis no inflamatoria tal como osteoartritis (Stohl *et al.*, 2006, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 351-8; Tan *et al.*, 2003, *Arthritis Rheum* 48, 982-92).

30 Varios estudios se han centrado en la presencia de APRIL en el suero de pacientes que padecen una serie más amplia de enfermedades reumáticas basadas en inmunidad sistémica (que ahora también incluyen síndrome de Sjögren, síndrome de Reiter, artritis psoriásica, polimiositis, y espondilitis anquilosante) y han descubierto niveles de APRIL aumentados significativamente en estos pacientes, lo que sugiere un papel importante para APRIL también en estas enfermedades, (Jonsson *et al.*, 1986, *Scand J Rheumatol Supl* 61, 166-9; Roschke *et al.*, 2002, *J Immunol* 169, 4314-21).

40 Finalmente, la expresión de APRIL aumentada también se ha ligado a esclerosis múltiple (EM). Se ha descubierto que la expresión de APRIL aumentaba en los astrocitos de pacientes que padecían EM en comparación con controles normales. Esto está acorde con la expresión de APRIL descrita en glioblastomas y en el suero de pacientes con glioblastoma (Deshayes *et al.*, 2004, *Oncogene* 23, 3005-12; Roth *et al.*, 2001, *Cell Death Differ* 8, 403-10).

45 APRIL desempeña un papel clave en la supervivencia y capacidad proliferativa de varios tumores malignos de linfocitos B y potencialmente también algunos tumores sólidos. APRIL también está apareciendo como un agente clave en enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Por lo tanto, son estrategias para antagonizar APRIL un objetivo terapéutico para varias de estas enfermedades. De hecho se están realizando en la actualidad estudios clínicos que se dirigen a APRIL con TACI-Fc (Atacicept) para tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, TACI-Fc también se dirige a BAFF, un factor implicado en el mantenimiento de linfocitos B normales. Se han descubierto anticuerpos dirigidos contra APRIL en los documentos WO9614328, WO2001/60397 WO2002/94192, WO9912965, WO2001/196528 y WO9900518. Esta invención describe anticuerpos que se dirigen específicamente a APRIL. Los anticuerpos en esta invención bloquean completamente la unión de APRIL con TACI y al menos parcialmente con BCMA. Algunos anticuerpos de acuerdo con la invención bloquean completamente la unión tanto de BCMA como de TACI. Dichas moléculas son útiles en una terapia para varias afecciones en las que APRIL soluble en circulación se correlaciona con actividad y progresión de enfermedad. Ya que los niveles de expresión de APRIL pueden usarse como marcadores de diagnóstico y pronóstico para diferentes enfermedades, estos anticuerpos también pueden aplicarse en dichos ensayos.

60 La invención proporciona compuestos de unión seleccionados de anticuerpos o fragmentos de unión que se unen con APRIL humano que comprenden:

- 65 a) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente, o una variante de cualquiera de dichas secuencias que comprende hasta tres modificaciones de aminoácidos; y  
b) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente, o una variante de cualquiera de dichas secuencias que comprende hasta tres modificaciones de aminoácidos,

en los que los compuestos de unión se unen con el epítipo de APRIL humano conformacional SMPSPH, y preferentemente con IRSMP-SHPDRA, y en los que el compuesto de unión bloquea completamente la unión de APRIL con TACI humano y bloquea al menos parcialmente la unión de APRIL con BCMA humano.

5 El compuesto de unión bloquea la unión con TACI y BCMA e incluye CDR de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 12, 13, 14 y CDR de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 9, 10, 11. En algunas realizaciones, el compuesto de unión es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

10 En una realización, la invención proporciona un compuesto de unión que se une con APRIL humano que comprende CDR de cadena pesada de anticuerpo SEQ ID NO: 9, 10 y 11, o variantes de cualquiera de dichas secuencias; y CDR de cadena ligera de anticuerpo SEQ ID NO: 12, 13 y 14, o variantes de cualquiera de dichas secuencias.

15 En otra realización, la invención comprende un compuesto de unión que se une con APRIL humano que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 6.

20 En otra realización la invención comprende un anticuerpo, en el que la cadena pesada tiene la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 5 y se une con una región constante de IgG1 y la cadena ligera tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6 y se une con la región constante κ. En particular, la región constante es de origen de ratón o humano. Más en particular, el anticuerpo es hAPRIL.01A.

25 En otra realización la invención comprende una variante de un compuesto de unión que se une con APRIL humano, en el que cualquiera de dicha variante o dichas variantes puede comprender hasta tres modificaciones de aminoácidos en las CDR previamente identificadas de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo.

30 En otra realización la invención comprende una variante de un compuesto de unión que se une con APRIL humano, en el que cualquiera de dicha variante o dichas variantes puede comprender hasta tres modificaciones de aminoácidos en cada una de las CDR previamente identificadas en cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo.

35 En otra realización la invención comprende una variante de un compuesto de unión que se une con APRIL humano, en el que cualquiera de dicha variante o dichas variantes puede comprender hasta tres modificaciones de aminoácidos en las secuencias de CDR previamente identificadas en cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo.

El compuesto de unión de la invención bloquea completamente la unión de APRIL con TACI humano y bloquea al menos parcialmente la unión con BCMA humano.

En otra realización la invención comprende un compuesto de unión que bloquea completamente la unión de APRIL con TACI humano y con BCMA humano.

40 En otra realización la invención comprende un compuesto de unión que se une con APRIL humano, en el que el compuesto de unión se une con APRIL humano con una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM o menos; y bloquea la unión de TACI humano y/o BCMA humano con APRIL humano con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 2 nM o menor.

El compuesto de unión de la invención se une con el epítipo conformacional de APRIL humano SMPSPH (preferentemente IRSMP-SHPDRA) opcionalmente apoyado por TLFPR y/o QDVTFTMGQ.

45 En algunas realizaciones el compuesto de unión de la invención es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

En otra realización el compuesto de unión de la invención es un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

En otra realización el compuesto de unión de la invención es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

50 En otra realización la invención comprende un compuesto de unión, preferentemente un anticuerpo humanizado, con las CDR anteriormente identificadas y una variante de región constante de cadena pesada humana y una variante de región constante de cadena ligera humana, en el que cada variante de región constante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificadas de forma conservativa.

En otra realización el compuesto de unión de la invención es un fragmento de anticuerpo seleccionado de Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, mAb biespecífico o un fragmento de diacuerpo.

55 La invención también comprende el compuesto de unión como se ha descrito anteriormente que inhibe la proliferación y supervivencia de linfocitos B.

La invención también comprende ácidos nucleicos que codifican el compuesto de unión anti APRIL de la invención.

La invención también comprende células y vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican el compuesto de unión de la invención.

60 Además, la invención comprende un método para producir un compuesto de unión de la invención que comprende: (a) cultivar la célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en medio de cultivo en condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico se expresa, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y (b) recuperar los polipéptidos de la célula hospedadora o medio de cultivo.

65 La invención también comprende composiciones que comprenden un compuesto de unión de la invención en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también comprende un método para inhibir la proliferación y/o supervivencia de una célula inmunitaria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de

unión de la invención. En una realización, el método puede usarse para tratar el cáncer. En otra realización, el método puede usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

En algunas realizaciones, la invención comprende un método para inhibir la proliferación y/o supervivencia de una célula inmunitaria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de unión de la invención, y que comprende además medir la proliferación de linfocitos B y/o supervivencia *ex vivo* en una muestra derivada del sujeto, en el que una inhibición de la proliferación y/o supervivencia del linfocito B indica que el tratamiento debería continuarse.

En otras realizaciones, la invención comprende un método para inhibir la proliferación y/o supervivencia de una célula inmunitaria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de unión de la invención, y que comprende además medir la proliferación de linfocitos B y/o supervivencia *ex vivo* en una muestra derivada del sujeto, en el que un aumento en la proliferación de linfocitos B y/o supervivencia predice la probabilidad de que el tratamiento sea exitoso.

La invención en ciertas realizaciones también comprende un compuesto de unión anti APRIL de la invención, ligado a un agente terapéutico tal como una toxina bacteriana o una radiotoxina. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, mitomicina, etopósido y vincristina u otros antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos y antimitóticos.

La invención también comprende un método para inhibir la proliferación y/o supervivencia de una célula inmunitaria, que comprende poner en contacto una célula inmunitaria con un compuesto de unión de la presente invención.

En algunas realizaciones el método comprende administrar además un segundo agente terapéutico o modalidad de tratamiento.

En algunas realizaciones, los compuestos de unión anti APRIL pueden combinarse con un tratamiento que se considera que la norma de cuidado en cáncer o enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. El accionamiento para dichas combinaciones es que la inhibición inmunitaria aumentada actual por anti APRIL inducirá o facilitará una respuesta clínica inicial al tratamiento de norma de cuidado, respuesta clínica duradera inducible y control inmunitario a largo plazo de enfermedad.

En otra realización los compuestos de unión de la presente invención se usan de forma diagnóstica.

En otra realización más los compuestos de unión de la invención se usan para medir la proliferación y/o supervivencia de linfocitos B *ex vivo* en una muestra derivada del sujeto, en el que una inhibición de la proliferación y/o supervivencia del linfocito B indica que el tratamiento con el compuesto de unión como se ha descrito anteriormente en el presente documento debería continuarse.

En otra realización los compuestos de unión de acuerdo con la invención son anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpo que se unen con APRIL humano.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que muestra la actividad biológica deseada, tal como inhibir la unión de un ligando con su receptor, o inhibir la señalización inducida por ligando de un receptor. Por lo tanto, "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

"Fragmento de anticuerpo" y "fragmento de unión a anticuerpo" significan fragmentos de unión a antígeno y análogos de un anticuerpo, típicamente que incluyen al menos una parte de las regiones de unión a antígeno o variables (por ejemplo una o más CDR) del anticuerpo parental. Un fragmento de anticuerpo conserva al menos algo de la especificidad de unión del anticuerpo parental. Típicamente, un fragmento de anticuerpo conserva al menos 10 % de la actividad de unión parental cuando esa actividad se expresa de forma molar. Preferentemente, un fragmento de anticuerpo conserva al menos 20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de la afinidad de unión del anticuerpo parental por la diana. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias, por ejemplo, sc-Fv, unicuerpos (tecnología de Genmab); nanocuerpos (tecnología de Domantis); anticuerpos de dominio (tecnología de Ablynx); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Se revisan variantes de anticuerpo modificadas técnicamente en Holliger y Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23, 1126-1136.

Un "fragmento Fab" está comprendido por una cadena ligera y las regiones C<sub>H1</sub> y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub> de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen unidos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios de C<sub>H3</sub>.

Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene el dominio V<sub>H</sub> y el dominio C<sub>H1</sub> y también la región entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de modo que pueda formarse un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')<sub>2</sub> está compuesto por lo tanto de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

5 Un "anticuerpo Fv monocatenario" (o "anticuerpo scFv") se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permiten que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun, 1994, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315. Véase también, Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 88/01649 y Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778 y 5.260.203.

15 Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño con dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado con un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H$ - $V_L$  o  $V_L$ - $V_H$ ). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Holliger *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448.

20 Un "fragmento de anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones  $V_H$  se unen de forma covalente con un enlazador peptídico para crear un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones  $V_H$  de un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo antígeno o antígenos diferentes.

30 Como se usa en el presente documento el anticuerpo hAPRIL.01A es un anticuerpo de ratón en el que la cadena pesada tiene la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 5 y se une con una región constante IgG1 y la cadena ligera tiene la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 6 y se une con la región constante  $\kappa$ . El anticuerpo hAPRIL.03A (no de acuerdo con la invención reivindicada) es un anticuerpo de ratón, en el que la cadena pesada tiene la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 7 y se une con una región constante de IgG1 y la cadena ligera tiene la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 8 y se une con la región constante  $\kappa$ .

35 Un fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una parte suficiente de la región constante para permitir la dimerización (o multimerización) de cadenas pesadas que tienen capacidad de enlace disulfuro reducida, por ejemplo cuando al menos una de las cisteínas de bisagra normalmente implicadas en el enlace disulfuro entre cadenas pesadas está alterada como se describe en el presente documento. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión con FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y/o unión al complemento (por ejemplo, cuando el anticuerpo tiene un perfil de glucosilación necesario para la función de ADCC o unión al complemento).

45 La expresión anticuerpo "quimérico" se refiere a anticuerpos en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán esencialmente las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos de roedores parentales, aunque pueden incluirse ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado, o por otras razones. Sin embargo, como los intercambios de bucle de CDR no dan como resultado de forma uniforme un anticuerpo con las mismas propiedades de unión que el anticuerpo de origen, los cambios en los restos de marco conservado (FR), restos implicados en el soporte de bucle de CDR, también podrían introducirse en anticuerpos humanizados para conservar la afinidad de unión a antígeno (Kabat *et al.*, 1991, J. Immunol. 147, 1709).

El término “anticuerpo” también incluye anticuerpos “completamente humanos”, es decir, anticuerpos que comprenden secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana solamente. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos murinas si se producen en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De forma similar, “anticuerpo de ratón” o “anticuerpo de rata” se refieren a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente. Puede generarse un anticuerpo completamente humano en un ser humano, en un animal transgénico que tiene secuencias de línea germinal de inmunoglobulina humana, por presentación en fagos u otros métodos biológicos moleculares. Además, también pueden prepararse inmunoglobulinas recombinantes en ratones transgénicos. Véase Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15,146-156. Véase también tecnologías Abgenix y Medarex.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.624.821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta, 2006, *Adv. Drug Delivery Rev.* 58: 640-656. Dicha modificación puede usarse para potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, supresiones e inserciones), glucosilación o desglucosilación, y adición de múltiples Fc. Los cambios al Fc también pueden alterar la semivida de anticuerpos en anticuerpos terapéuticos, y una semivida más larga daría como resultado una dosificación menos frecuente, con la conveniencia aumentada y el uso reducido del material conjunto. Véase Presta, 2005, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 731 en 734-35.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc intactas que proporcionan funciones efectoras completas, por ejemplo anticuerpos de isotipo IgG1, que inducen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en la célula diana.

Los anticuerpos también pueden conjugarse (por ejemplo, unirse covalentemente) con moléculas que mejoran la estabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento o aumentan la semivida del anticuerpo *in vivo*. Son ejemplos de moléculas que aumentan la semivida albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano) y polietilenglicol (PEG). Pueden prepararse derivados de anticuerpos ligados a albúmina y PEGilados usando técnicas bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Chapman, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 531-545; Anderson y Tomasi, 1988, *J. Immunol. Methods* 109, 37-42; Suzuki *et al.*, 1984, *Biochim. Biophys. Acta* 788, 248-255; y Brekke y Sandlie, 2003, *Nature Rev.* 2, 52-62.

Los anticuerpos usados en la presente invención habitualmente se unirán con al menos un  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-3}$  M, más habitualmente al menos  $10^{-6}$  M, típicamente de al menos  $10^{-7}$  M, más típicamente al menos  $10^{-8}$  M, preferentemente al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M y más preferentemente al menos  $10^{-10}$  M, y más preferentemente al menos  $10^{-11}$  M. Véase, por ejemplo, Presta, *et al.*, 2001, *Thromb. Haemost.* 85, 379-389; Yang, *et al.*, 2001, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38, 17-23; Carnahan, *et al.*, 2003, *Clin. Cancer Res. (Supl.)* 9 3982s-3990s. Las afinidades de anticuerpos pueden determinarse usando análisis convencional.

La expresión “región hipervariable”, como se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR”, definida por alineamiento de secuencias, por ejemplo restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; véase Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. y/o los restos de un “bucle hipervariable” (HVL), como se define estructuralmente, por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; véase Chothia y Leskl, 1987, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917. Los restos de “marco conservado” o “FR” son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento.

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

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante que está asociada habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o situación en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que 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, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, 1975, Nature 256, 495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991, Nature 352, 624-628 y Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222, 581-597, por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos".

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula inmunitaria" incluye células que son de origen hematopoyético y que desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T; linfocitos citolíticos naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

Como se usa en el presente documento, un "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo anti APRIL, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una toxina bacteriana, un fármaco citotóxico o una radiotoxina. Los restos tóxicos pueden conjugarse con anticuerpos de la invención usando métodos disponibles en la técnica.

Como se usa en el presente documento, una secuencia "variante" se refiere a una secuencia que difiere de la secuencia desvelada en uno o más restos de aminoácidos pero que conserva la actividad biológica de la molécula resultante.

"Variantes modificadas de forma conservativa" o "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a sustituciones de aminoácidos que se conocen por los expertos en la materia y pueden realizarse en general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en este campo reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, *et al.*, Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª Edición 1987)). Dichas sustituciones ejemplares se realizan preferentemente de acuerdo con las expuestas posteriormente de la siguiente manera:

Sustituciones de aminoácidos conservativas ejemplares

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	He; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; He; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por



ejemplo, "aproximadamente" puede significar a una distancia de 1 o más de 1 desviación típica según la práctica de la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar un intervalo de hasta 20 %. Además, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, las expresiones pueden significar hasta un orden de magnitud de hasta 5 veces de un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a no ser que se indique de otro modo, el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" debería suponerse que está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor particular.

Se une "específicamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, por ejemplo, APRIL, en una población heterogénea de proteínas y/u otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones designadas, un ligando/antígeno específico se une a un receptor/anticuerpo particular y no se une en una cantidad significativa con otras proteínas presentes en la muestra.

"Administración" y "tratamiento", como se aplica a un sujeto animal, humano, experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere al contacto de un agente farmacéutico, terapéutico, de diagnóstico exógeno, o composición al animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" pueden referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, en el que el fluido está en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por un reactivo, diagnóstico, composición de unión o por otra célula.

#### Anticuerpos monoclonales

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales para APRIL humano de acuerdo con el conocimiento y la experiencia de la técnica de inyección en sujetos de ensayo de antígeno APRIL humano y después aislamiento de hibridomas que expresan anticuerpos que tienen la secuencia o características funcionales deseadas.

Se aísla fácilmente ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá en más detalle posteriormente.

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

#### Anticuerpos quiméricos

El ADN de anticuerpo también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo con la secuencia codificante 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.*, 1984, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81, 6851), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de material distinto de inmunoglobulina (por ejemplo, dominios proteicos). Típicamente dicho material distinto de inmunoglobulina sustituye los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituye los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

#### Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos de una fuente que no es humana. Los restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", y se toman típicamente de un dominio variable "importado". Puede realizarse humanización generalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332, 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239, 1534-1536), sustituyendo con CDR de roedores o secuencias de CDR las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos

en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores.

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

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite 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 con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de las secuencias receptora e importada de modo que se consigue la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia en la unión a antígeno.

La humanización de anticuerpos es una tarea de ingeniería proteica sencilla. Casi todos los anticuerpos murinos pueden humanizarse por injertos de CDR, dando como resultado la conservación de unión a antígeno. Véase, Lo, Benny, K. C., editor, en *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, volumen 248, Humana Press, Nueva Jersey, 2004.

Como alternativa, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de región de unión a cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551; Jakobovits *et al.*, 1993, Nature 362, 255-258; Bruggermann *et al.*, 1993, Year in Immunology 7, 33; y Duchosal *et al.*, 1992, Nature 355, 258. Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 227,381; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597; Vaughan *et al.*, 1996, Nature Biotech 14, 309).

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos anti APRIL humanizados introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en los ADN de anticuerpos anti APRIL humanizados, o por síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para los anticuerpos anti-APRIL humanizados. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales de los anticuerpos anti APRIL humanizados, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de los polipéptidos de anticuerpos anti APRIL humanizados que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina", como se describe en Cunningham y Wells, 1989, Science 244, 1081-1085. Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno APRIL. Los restos de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón diana o la región y las variantes de anticuerpos anti APRIL humanizados expresados se exploran con respecto a la actividad deseada.

Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti APRIL humanizados tendrán una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanizados originales de la cadena pesada o la ligera, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 %, 98 % o 99 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos humanizados, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia de anticuerpo se interpretará como influyente en la identidad u homología de secuencias.

Los anticuerpos que tienen las características identificadas en el presente documento, como deseables en anticuerpos anti APRIL humanizados, pueden explorarse con respecto a la actividad biológica inhibidora *in vitro* o afinidad de unión adecuada. Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con los epítomos de BCMA o TACI en APRIL humano unido con un anticuerpo de interés (por ejemplo, los que bloquean la unión de APRIL), puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Los anticuerpos que se unen con el mismo epítomo probablemente se bloqueen de forma cruzada en dichos ensayos, pero no todos los anticuerpos de bloqueo cruzado se unirán necesariamente exactamente en el mismo epítomo ya que el bloqueo cruzado puede resultar de impedimento estérico de la unión del anticuerpo por anticuerpos que se unen en epítomos solapantes, o incluso epítomos no solapantes cercanos.

Como alternativa, puede realizarse el mapeo de epítomos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une con un epítomo de interés. "Mutagénesis de exploración de alanina", como se describe en Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244, 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de restos de aminoácidos en APRIL humano también puede usarse para determinar el epítomo funcional para anticuerpos anti APRIL de la presente invención.

Pueden obtenerse anticuerpos adicionales que se unen con el mismo epítomo como un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, explorando anticuerpos inducidos contra APRIL con respecto a unión con el epítomo, o mediante inmunización de un animal con un péptido que comprende un fragmento de APRIL que comprende las secuencias epitópicas (por ejemplo, BCMA o TACI). Podría esperarse que los anticuerpos que se unen con el mismo epítomo funcional mostraran actividades biológicas similares, tales como unión con el receptor de bloqueo, y dichas actividades pueden confirmarse por ensayos funcionales de los anticuerpos.

Pueden determinarse afinidades de anticuerpo usando análisis convencional. Son compuestos de unión preferidos tales como por ejemplo anticuerpos humanizados los que se unen con APRIL humano con un valor de  $K_d$  de no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$ ; preferentemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$ ; más preferentemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$ ; y más preferentemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  o incluso  $1 \times 10^{-11}$  M.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Puede usarse cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También se contemplan variantes de los isotipos de IgG. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. Se consigue fácilmente optimización de las secuencias de dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada explorando los anticuerpos en los ensayos biológicos descritos en los Ejemplos.

De forma similar, puede usarse cualquier clase de cadena ligera en las composiciones y métodos del presente documento. Específicamente, kappa, lambda o variantes de las mismas son útiles en las presentes composiciones y métodos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención también pueden conjugarse con cargas útiles citotóxicas tales como agentes citotóxicos o radionucleótidos tales como  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{At}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{234}\text{Th}$ , y  $^{40}\text{K}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{Tr}$  y  $^{56}\text{Fe}$ . Dichos conjugados de anticuerpo pueden usarse en inmunoterapia para dirigirse selectivamente a y destruir células que expresan una diana (el antígeno para ese anticuerpo) en su superficie. Los agentes citotóxicos ejemplares incluyen ricina, alcaloides de la vinca, metotrexato, exotoxina de *Pseudomonas*, saporina, toxina diftérica, cisplatino, doxorubicina, toxina abrina, gelonina y proteína antiviral de ombú.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención también pueden conjugarse con marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluyendo fluoróforos tales como quelados de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina,  $^{152}\text{Eu}$ , dansilo, umbeliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de aeuorina, 2,3-dihidroftalazinedionas, biotina/avidina, marcadores de espín y radicales libres estables.

Puede emplearse cualquier método conocido de la técnica para conjugar las moléculas de anticuerpo o moléculas proteicas de la invención con los diversos restos, incluyendo los métodos descritos en Hunter *et al.*, 1962, *Nature* 144, 945; David *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13,1014; Pain *et al.*, 1981, *J. Immunol. Meth.* 40, 219; y Nygren, J., 1982, *Histochem. y Cytochem.* 30, 407. Son convencionales y se conocen bien en la técnica métodos para conjugar anticuerpos y proteínas.

## Purificación de anticuerpos

5 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, se retiran los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10, 163-167 describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilo fluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Pueden retirarse los residuos celulares por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar en general usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

15 La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas gamma.1, gamma.2 o gamma.4 (Lindmark *et al.*, 1983, *J. Immunol. Meth.* 62, 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma.3 humano (Guss *et al.*, 1986, *EMBO J.* 5, 1567-1575). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para purificación. También están disponibles dependiendo del anticuerpo para recuperar otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía por ordenador, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo para recuperar.

35 En una realización, la glucoproteína puede purificarse usando adsorción en un sustrato de lectina (por ejemplo una columna de afinidad de lectina) para retirar la glucoproteína que contiene fucosa de la preparación y de este modo enriquecer con respecto a glucoproteínas sin fucosa.

## Formulaciones farmacéuticas

40 La invención comprende formulaciones farmacéuticas de un compuesto de unión a APRIL. Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, el anticuerpo o fragmento del mismo se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Pueden prepararse formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, pastas, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.*, 2001, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.), 1993, Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie, 2000, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

55 La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpo, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub>. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos queda preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

65 Las vías adecuadas de administración incluyen administración parenteral, tal como administración intramuscular, intravenosa o subcutánea y administración oral. La administración de anticuerpo usada en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente invención puede llevarse a cabo de diversas maneras convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. En una realización, el compuesto de unión de la invención se

administra por vía intravenosa. En otra realización, el compuesto de unión de la invención se administra por vía subcutánea.

5 Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del anticuerpo directamente en el sitio de acción, con frecuencia en una formulación de liberación de depósito o sostenida. Además, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de suministro de fármaco dirigido.

10 Está disponible orientación en la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak, 1996, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.), 1991, *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.), 1993, *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 348, 601-608; Milgrom, *et al.*, 1999, *New Engl. J. Med.* 341, 1966-1973; Slamon, *et al.*, 2001, *New Engl. J. Med.* 344, 783-792; Beniaminovitz, *et al.*, 2000, *New Engl. J. Med.* 342, 613-619; Ghosh, *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 348, 24-32; Lipsky, *et al.*, 2000, *New Engl. J. Med.* 343, 1594-1602).

20 Se realiza la determinación de la dosis apropiada por el especialista clínico, por ejemplo, usando parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o se predice que afectan al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en incrementos pequeños en lo sucesivo hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

25 Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total es generalmente al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, más generalmente al menos 0,2 µg/kg, más generalmente al menos 0,5 µg/kg, típicamente al menos 1 µg/kg, más típicamente al menos 10 µg/kg, más típicamente al menos 100 µg/kg, preferentemente al menos 0,2 mg/kg, más preferentemente al menos 1,0 mg/kg, más preferentemente al menos 2,0 mg/kg, óptimamente al menos 10 mg/kg, más óptimamente al menos 25 mg/kg y más óptimamente al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 349, 427-434; Herold, *et al.*, 2002, *New Engl. J. Med.* 346, 1692-1698; Liu, *et al.*, 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67, 451-456; Portielji, *et al.*, 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 133-144). La dosis deseada de una molécula pequeña terapéutica, por ejemplo, un péptido mimético, producto natural o compuesto químico orgánico, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en moles/kg.

35 Como se usa en el presente documento, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluye un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados con la enfermedad y/o una reducción en la gravedad de dichos síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen con dicha enfermedad. Los términos incluyen además aliviar síntomas existentes, prevenir síntomas adicionales y aliviar o prevenir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por lo tanto, los términos indican que se ha conferido un resultado beneficioso en un sujeto vertebrado con una enfermedad.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti APRIL o fragmento del mismo, que cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, un tejido o un sujeto es eficaz para prevenir o aliviar la enfermedad o afección para tratar. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a la cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado alivio de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o alivio de la afección médica relevante, o un aumento de la tasa de tratamiento, curación, prevención o alivio de dichas condiciones. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solamente. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, bien administrados en combinación, bien en serie o bien simultáneamente. Una cantidad eficaz de producto terapéutico reducirá los síntomas típicamente en al menos 10 %; habitualmente en al menos 20 %; preferentemente al menos aproximadamente 30 %; más preferentemente al menos 40 % y más preferentemente al menos 50 %.

55 Se conocen bien en la técnica métodos para coadministración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (eds.), 2001, Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10<sup>o</sup> ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.), 2001, *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.), 2001, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., PA.

60 La composición farmacéutica de la invención también puede contener otro agente, incluyendo pero sin limitación un agente citotóxico, quimioterapéutico, citostático, antiangiogénico o antimetabolito, un agente dirigido a tumor, un agente inmunoestimulante o inmunomodulador o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, citostático o tóxico de otro modo. La composición farmacéutica también puede emplearse con otras modalidades terapéuticas tales como cirugía, quimioterapia y radiación.

65

Usos terapéuticos para el anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la invención

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención, que se unen específicamente con APRIL humano, pueden usarse para tratar varias enfermedades en las que la actividad de APRIL es central para la patología. Hablando en general esto incluye cáncer, autoinmunidad, enfermedades inflamatorias y potencialmente esclerosis múltiple, una enfermedad del SNC.

#### *Cáncer*

El anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de la invención que se unen específicamente con APRIL pueden usarse para tratar cáncer. Los cánceres preferidos cuyo crecimiento y supervivencia pueden inhibirse por inhibición incluyen cualquier cáncer que se sepa que expresa APRIL y depende de este para señales proliferativas. Los ejemplos no limitantes de dichos cánceres incluyen varios tumores malignos de linfocitos B, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin incluyendo linfoma de Burkitt y linfoma de linfocitos B grande difuso, y también potencialmente varios tumores sólidos tales como glioblastomas, en los que se ha indicado expresión de APRIL.

Los compuestos de unión de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes antineoplásicos, tales como reactivos quimioterapéuticos u otros agentes biológicos. Adicionalmente la invención incluye tumores malignos refractarios o recurrentes o tratamiento de metástasis derivadas de cualquiera de estos tumores malignos.

#### *Enfermedad autoinmunitaria*

Los compuestos de unión de la invención pueden usarse para tratar varias enfermedades autoinmunitarias, en las que se ha mostrado que la expresión de APRIL desempeña un papel en la patología. Son ejemplos de dichas enfermedades artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES) y síndrome de Sjogren. Además, se descubrieron títulos mayores de lo normal de APRIL en el suero de pacientes con esclerosis múltiple y también se encontraron niveles aumentados en sus astrocitos. Por lo tanto, APRIL es un factor contribuyente a la patología de enfermedad y el bloqueo terapéutico de APRIL en EM puede ser beneficioso.

Usos no terapéuticos para el anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la invención

Los usos no terapéuticos para estos anticuerpos incluyen citometría de flujo, transferencia de Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunohistoquímica.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse como un reactivo de purificación de afinidad mediante inmovilización en una columna de sepharose.

El anticuerpo puede ser útil también en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de APRIL en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo típicamente se marcará (bien directa o bien indirectamente) con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse en general en las siguientes categorías: biotina, fluorocromos, radionucleótidos, enzimas, yodo y marcadores biosintéticos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

El anticuerpo puede usarse también para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido de modo que el antígeno o las células que lo expresan pueden localizarse usando inmunoescintigrafía o tomografía de emisión de positrones.

Leyendas de las figuras

#### Figura 1

La Figura 1 muestra la reactividad a APRIL y actividad de bloqueo de BCMA de sobrenadantes de hibridoma hAPRIL.01A y hAPRIL.03A. La Figura 1A muestra unión de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A con FLAG-hAPRIL capturado por un anticuerpo anti FLAG. Se usó anticuerpo Aprily-5 como un control positivo. La Figura 1B demuestra que los sobrenadantes de hibridoma hAPRIL.01A y hAPRIL.03A, y no Aprily-5 bloquean la unión de FLAG-hAPRIL con BCMA-Fc.

#### Figura 2

La Figura 2 muestra características de bloqueo de receptor y de unión definidas de anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A purificados. La Figura 2A confirma la unión de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A purificados con FLAG-hAPRIL, capturado por un anticuerpo anti FLAG. La Figura 2B muestra que solamente hAPRIL.03A se une con FLAG-hAPRIL que se captura por BCMA-Fc. La Figura 2C muestra que hAPRIL.01A bloquea completamente la unión de FLAG-hAPRIL con BCMA-Fc, mientras que hAPRIL.03A bloquea parcialmente esta interacción. La Figura 2D demuestra que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A bloquean ambos completamente FLAG-hAPRIL con TACI-Fc.

## Figura 3

La Figura 3 muestra los ELISA de bloqueo del receptor para hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y 12 anticuerpos monoclonales anti APRIL disponibles en el mercado conocidos. Esto ilustra que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A son  
5 únicos en su capacidad para bloquear la unión de APRIL con BCMA (Figura 3A) y TACI (Figura 3B).

## Figura 4

La Figura 4 muestra que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A bloquean la proliferación de linfocitos B conducida por APRIL y el cambio de clase de isotipo pero no afectan a procesos mediados por BAFF. La Figura 4A es un ensayo de linfocitos B *in vitro* que demuestra que los anticuerpos monoclonales descritos bloquean funciones de APRIL  
10 conocidas tales como la supervivencia y proliferación de linfocitos B y producción de anticuerpos IgA con clase cambiada. Es importante la demostración de que ambos anticuerpos monoclonales bloquean la actividad de APRIL más eficazmente que TACI-Fc, que se administró a concentración equimolar. La Figura 4B muestra que los anticuerpos no afectan a las respuestas de linfocitos B conducidas por BAFF, mientras que TACI-Fc bloquea estos  
15 procesos.

## Figura 5

La Figura 5 muestra los resultados de dirigir APRIL hAPRIL.01A y hAPRIL.03A (panel A) o TACI-Fc (panel B) *in vivo*, en una respuesta de linfocitos B independiente de T. Se expusieron ratones transgénicos a NP-Ficolin, y se trataron con hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y TACI-Fc dos veces por semana. Se usaron PBS e IgG1 de ratón como controles negativos. Los títulos de inmunoglobulina (IgA, IgM e IgG) se midieron por ELISA. hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y en menor medida TACI-Fc son capaces de inhibir respuestas de linfocitos B mediadas por APRIL en los ratones transgénicos hAPRIL y reducir los niveles de inmunoglobulina a los del WT.  
20

## Figura 6

La Figura 6 muestra el efecto de dirigir APRIL hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y TACI-Fc en poblaciones de linfocitos B en el bazo (panel A) o en la cavidad peritoneal (panel B). Se expusieron ratones transgénicos a NP-Ficolin, y se trataron con hAPRIL.01A, hAPRIL.03A, TACI-Fc dos veces por semana. Se usaron PBS e IgG1 de ratón como controles negativos. Después de 30 días de tratamiento, se recogieron bazos y células de la cavidad peritoneal y se analizaron por citometría de flujo. El tratamiento con hAPRIL.01A o hAPRIL.03A no afectó a la (sub)población de linfocitos B en el bazo. Por el contrario, TACI-Fc redujo en gran medida la población de linfocitos B total y subpoblaciones madura y T2. En la cavidad peritoneal, TACI-Fc afectó a la relación de células B1 frente a B2, mientras que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A no afectaron a estas subpoblaciones.  
25

## Figura 7

La Figura 7 muestra las secuencias de región variable de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A. Las figuras 7A y 7B muestran las secuencias de aminoácidos de la secuencia variable de cadena pesada y ligera de hAPRIL.01A, respectivamente. Las Figuras 7C y 7D muestran las secuencias de aminoácidos de la secuencia variable de cadena pesada y ligera de hAPRIL.03A, respectivamente.  
30

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Inmunización y selección de anticuerpos anti APRIL. Inmunización de ratones con ADNc de APRIL

Para generar anticuerpos contra la proteína APRIL humana, se subclonó un ADNc que codificaba la fase abierta de lectura de longitud completa de APRIL en el vector pCI-neo (Promega, Madison, WI). Se comprobó la expresión del vector obtenido por transfección transitoria de pCI-neo-hAPRIL en células 293 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) e inmunotransferencia con IgG1 Aprily-5 de ratón anti hAPRIL (1:5000) (Alexis, San Diego, CA), seguido de IgG1-HRP de cabra anti ratón (1:2000) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL).  
35

Los ratones se inmunizaron por inmunización con pistola génica usando una pistola Génica Helios (BioRad, Hercules, CA) y balas de oro recubiertas con ADN (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron partículas de oro de 1 µm con ADNc de pCI-neo-hAPRIL y vectores de expresión comerciales para Flt3L ratón y GM-CSF de ratón en una relación 2:1:1 (ambos de Aldevron, Fargo, ND). Se usó un total de 1 µg de ADN plasmídico para recubrir 500 µg de balas de oro.  
40

Específicamente, se inmunizaron ratones BALB/c hembra de 7-8 semanas de edad en las orejas con una pistola génica, recibiendo 4 o 5 ciclos de un disparo en ambas orejas. Aproximadamente, se detectó un título de anti hAPRIL 1:3200 por ELISA en suero de ratón después de tres inmunizaciones de ADN en el ELISA, todas las etapas de incubación se siguieron de una etapa de lavado con PBST (PBS con Tween 20 0,1 %) 3 veces. Se recubrieron inmunoplasmas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) con anticuerpo policlonal de conejo anti FLAG (50 ng/pocillo en PBS) (Sigma, St. Louis, MO) durante una noche a 4 °C y se bloquearon con suero de cabra 10 %/PBST durante 1 hora a TA. Las placas se incubaron con sobrenadante (1:4 en PBS) de células 293T transfectadas de forma transitoria con forma secretada de FLAG-hAPRIL conducida por promotor de CMV (pCR3-hAPRIL) durante 1 h a TA, seguido de incubaciones con diluciones de sueros de ratón e IgG de cabra anti ratón conjugado con HRP 1:2000 (Southern Biotechnology) durante 1 hora cada uno a TA. Después del lavado de PBST final, se visualizó la inmunorreactividad anti hAPRIL con 100 µl de sustrato OptiEIA TMB (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Las reacciones se detuvieron con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y se leyeron las absorbancias a 460 y 620 nm. Los ratones que  
45  
50  
55  
60  
65

demonstraron reactividad contra hAPRIL se inmunizaron una cuarta y última vez y se sacrificaron cuatro días después. Se prepararon poblaciones de células del bazo empobrecidos en eritrocitos como se ha descrito previamente (Steenbakkers *et al.*, 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers *et al.*, 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134) y se congelaron a -140 °C.

5

#### Selección de linfocitos B productores de anticuerpos anti APRIL

Para seleccionar clones de linfocitos B que producen anticuerpos anti APRIL, se sometieron  $1,5 \times 10^7$  esplenocitos empobrecidos en eritrocitos a dos ciclos de selección negativa en  $2,3 \times 10^7$  perlas activadas por tosilo Dynabeads® M-450 (Invitrogen, Carlsbad, CA) recubiertas con anticuerpo anti FLAG M2 (Sigma). Se usaron 50 µg de anticuerpo anti FLAG M2 para recubrir cada  $1 \times 10^8$  perlas en 500 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las perlas y la suspensión de esplenocitos se incubaron durante 30 minutos en hielo y se resuspendieron en DMEM F12/P/S/BCS 10 % frío. Los esplenocitos no unidos se separan de las perlas usando el MPC (concentrador de partículas magnéticas Dynal (Invitrogen)). Para la selección positiva, se incubaron esplenocitos con  $2,3 \times 10^7$  perlas recubiertas con anti FLAG M2 unido con FLAG-hAPRIL durante 30 minutos en hielo. Las perlas y los esplenocitos no unidos se separaron como se ha descrito anteriormente con un total de 12 lavados.

10

15

Se cultivaron linfocitos B específicos de antígeno como se describe en Steenbakkers *et al.*, 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134. Brevemente, se mezclaron linfocitos B seleccionados con sobrenadante de linfocitos B 7,5 % (v/v) y 50000 células de apoyo EL-5 B5 irradiadas (2500 RAD) en un volumen final de 200 µl de DMEM F12/P/S/BCS 10 % en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. El día ocho, los sobrenadantes se exploraron con respecto a reactividad a hAPRIL por ELISA como se ha descrito anteriormente. Se identificaron 21 sobrenadantes reactivos a APRIL y se ensayaron con respecto a su capacidad para inhibir la interacción de APRIL con BCMA-Fc. En el ELISA, todas las etapas de incubación se siguieron de una etapa de lavado con PBST (PBS con Tween 20 0,1 %) 3 veces. Se recubrió una inmunoplaaca de 96 pocillos Maxisorp con BCMA-Fc (50 ng/pocillo en PBS) (R & D Systems, Minneapolis, MN) durante una noche a 4 °C y se bloqueó con suero de cabra 10 %/PBST durante 1 hora a TA. Se preincubaron sobrenadantes que contenían FLAG-hAPRIL con sobrenadantes de linfocitos B que contenían anticuerpos durante 1 hora a TA y después se añadieron a la placa recubierta con BCMA-Fc durante 1 hora a TA. Se detectó FLAG-hAPRIL unido por incubación con anticuerpo anti FLAG BioM2-biotina1 µg/ml (Sigma) y estreptavidina-HRP 1:2000 (Biotecnología Southern) durante 1 hora cada uno a TA. Después del lavado de PBST final, se visualizó BCMA-Fc unido a APRIL con 100 µl de sustrato de OptiEIA TMB (BD Biosciences). Las reacciones se detuvieron con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y se leyeron las absorbancias a 460 y 620 nm.

20

25

30

Posteriormente, se inmortalizaron 8 clones de linfocitos B por minielectro fusión siguiendo los procedimientos publicados (Steenbakkers *et al.*, 1992, J. Immunol. Meth. 152, 69-77; Steenbakkers *et al.*, 1994, Mol. Biol. Rep. 19, 125-34). Específicamente, se mezclaron linfocitos B con  $10^6$  células de mieloma NS-1, y se retiró el suero lavando con medio DMEM F12. Las células se trataron con solución de pronasa durante tres minutos y se lavaron con medio de fusión. Se realizaron electrofusiones en una cámara de fusión de 50 µl mediante un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm seguido de un pulso de campo elevado, cuadrado, de 10 µs, 3 kV/cm y de nuevo mediante un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm. Los contenidos de la cámara se transfirieron a medio selectivo de hibridoma y se sembraron en una placa de 96 pocillos en condiciones de dilución limitante. El día 14 después de las fusiones, los sobrenadantes de hibridoma se exploraron con respecto a actividad de APRIL y actividad de bloqueo de BCMA, como se ha descrito anteriormente. Se aislaron dos hibridomas anti hAPRIL definidos, denominados hAPRIL.01A y hAPRIL.03A y se subclonaron por dilución limitante para salvaguardar su integridad. Se confirmó la reactividad de hAPRIL y actividad de bloqueo de BCMA de los anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A con sobrenadantes de hibridoma (véase la Figura 1).

35

40

45

#### Ejemplo 2: Purificación y caracterización de anticuerpos anti APRIL Estabilización de hibridomas productores anti APRIL y purificación de anticuerpos anti APRIL

Se obtuvieron poblaciones celulares clonales para cada hibridoma por múltiples ciclos de diluciones limitantes (seis para hAPRIL.01A y cuatro para hAPRIL.03A). Se cultivaron hibridomas estables en medio sin suero usando biorreactores CELLline (Integra-Biosciences, Chur, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 7-10 días de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm. Los sobrenadantes se diluyeron 1:1 en tampón de unión de alta salinidad (glicina 1 M/NaCl 2 M, pH 9,0) y los anticuerpos se purificaron con columnas de proteína G HiTrap de 5 ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Después de lavado de PBS de la columna, los anticuerpos se eluyeron con glicina 0,1 M pH 2,7 y se neutralizaron con Tris 3 M. Se intercambié PBS por el tampón usando columnas de filtración en gel PD-10 (GE Healthcare). Se concentraron anticuerpos con unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 (Millipore, Billerica, MA) y se cuantificaron usando espectrofotometría.

50

55

60

Usando un kit de ensayo de isotipación de anticuerpos monoclonales de ratón (Serotec, Raleigh, NC), se determinó que el (sub)isotipo de los anticuerpos tanto hAPRIL.01A como hAPRIL.03A era IgG1, Kappa.

#### Análisis de unión

Se realizaron experimentos de ELISA basados en proteínas usando anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A purificados para determinar las afinidades de unión aparentes (presentadas como valores de CE<sub>50</sub>). La unión se comparó con IgG1 Aprily-5 anti hAPRIL de ratón (Alexis). Se recubrieron inmunoplaacas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con anticuerpo policlonal de conejo anti FLAG (Sigma) o BCMA-Fc (R & D Systems) a 50 ng/pocillo en PBS durante una noche a 4 °C y se bloquearon con suero de cabra 10 %/PBST durante 1 h a TA. Las placas se lavaron

65



con PBST 3 veces y se incubaron con sobrenadante (1:4 en PBS) que contenía FLAG-hAPRIL durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron de nuevo con PBST 3 veces y se incubaron con anticuerpos hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y Aprily-5 (10 µg/ml de ensayo alto con diluciones 10 veces por triplicado) durante 1 h a TA. Después de tres lavados con PBST, se detectaron los anticuerpos unidos con IgG-HRP de cabra anti ratón (1:2000) (Southern Biotechnology) durante 1 hora a TA. La placa se lavó tres veces con PBST, y se visualizó la reactividad a APRIL con sustrato OptiEIA TMB (Becton Dickinson). La concentración para unión semimáxima se presenta como una medida de afinidad de unión relativa. Cuando se capturó FLAG-hAPRIL por el anticuerpo anti FLAG (Figura 2A), los valores de CE<sub>50</sub> para hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y Aprily-5 se calcularon como 2,2, 1,4 y 1,7 nM, respectivamente. Cuando se capturó FLAG-hAPRIL por BCMA-Fc (Figura 2B), no se observó unión del anticuerpo hAPRIL.01A, lo que sugiere que la interacción APRIL-BCMA bloqueó el epítipo de hAPRIL.01A. Por el contrario, se observó unión de hAPRIL.03A con el complejo APRIL-BCMA. La detección de anticuerpo del complejo de receptor-ligando puede demostrar ser útil en ensayos de diagnóstico y para fines de investigación para seguir la eliminación de APRIL soluble.

15 **Análisis cinético por interferometría biolumínica (ForteBio)**

Para caracterizar adicionalmente las características de unión de los anticuerpos, se realizó el perfil de cada uno usando interferometría biolumínica en el sistema Octet (ForteBio, Menlo Park, CA) para dilucidar la cinética de unión y calcular las constantes de unión en equilibrio. Este ensayo se realizó acoplando anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A purificados con biosensores reactivos a amina (ForteBio) usando química de amina convencional. Después se observó unión de APRIL humano recombinante (R & D Systems) con y disociación de los biosensores a dos concentraciones, 1 y 2 µg/ml. Específicamente, se prehumectaron biosensores reactivos a amina sumergiéndolos en pocillos que contenían MES 0,1 M pH = 5 durante 2 minutos. Los biosensores se activaron después usando una mezcla de NHS 0,1 M/EDC 0,4 M durante 5 minutos. Se acoplaron anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A sumergiéndolos en una solución de 5 µg/ml del anticuerpo durante 18 minutos. La superficie del biosensor se inactivó usando una solución de etanolamina 1 M pH 8,5 durante 7 minutos. Los biosensores se equilibraron en PBS durante 5 minutos. Se observó asociación de APRIL recombinante colocando los biosensores en pocillos que contenían APRIL 1 o 2 µg/ml y supervisando la interferometría durante 20 minutos. Se midió la disociación después de la transferencia de los biosensores a PBS y supervisión de la señal de interferometría durante 20 minutos. Las velocidades de asociación y disociación observadas (k<sub>obs</sub> y k<sub>d</sub>) se ajustaron usando un modelo de ajuste global de unión 1:1, y se calculó la constante de unión en equilibrio K<sub>D</sub> (véase Tabla 1).

Tabla 1. Características de unión del anticuerpo anti hAPRIL humanizado hAPRIL.01A de la invención y hAPRIL.03A

mAb	k <sub>obs</sub> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	k <sub>disoc</sub> s <sup>-1</sup>	K <sub>D</sub> M
hAPRIL.01 <sup>a</sup>	4,89E+04	3,69E-05	7,53E-10
hAPRIL.03A	7,54E+04	4,21E-05	5,58E-10

35 **Bloqueo de receptor**

Se confirmaron las capacidades de bloqueo de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A usando anticuerpos purificados. Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp con BCMA-Fc (R&D Systems) o TACI-Fc (R&D Systems) a 50 ng/pocillo durante una noche a 4 °C y se bloquearon con suero de cabra 10 %/PBST durante 1 hora a TA. Se preincubaron sobrenadantes que contenían FLAG-hAPRIL con anticuerpos hAPRIL.01A, hAPRIL.03A y Aprily-5 (ensayo alto de 10 µg/ml con diluciones 10 veces por triplicado) durante 1 h a TA. Las placas se lavaron con PBST 3 veces, y se detectó FLAG-hAPRIL unido mediante incubación con anticuerpo anti FLAG BioM2-biotina 1 µg/ml (Sigma) y estreptavidina-HRP 1:2000 (Southern Biotechnology) durante 1 hora cada uno a TA. Después del lavado de PBST final, se visualizó BCMA-Fc unido a APRIL con sustrato OptiEIA TMB (BD Biosciences). Como se muestra en las Figuras 2C y 2D, hAPRIL.01A bloquea completamente la unión de FLAG-hAPRIL con BCMA-Fc y TACI-Fc, mientras que hAPRIL.03A bloquea completamente la unión de FLAG-hAPRIL con TACI-Fc, bloqueando solamente parcialmente la interacción de hAPRIL-BCMA-Fc. Aprily-5 no bloquea la unión de FLAG-hAPRIL con BCMA-Fc o TACI-Fc. La concentración de inhibición semimáxima (CI<sub>50</sub>) se determinó para hAPRIL.01A como 1,2 y 0,4 nM para BCMA-Fc y TACI-Fc, respectivamente. La CI<sub>50</sub> para hAPRIL.03A para TACI-Fc se determinó como 1,3 nM.

50 **Anticuerpos comerciales**

Se obtuvieron anticuerpos anti APRIL disponibles en el mercado como se describe en la Tabla 2.

55 **Tabla 2. Anticuerpos monoclonales anti APRIL humano disponibles en el mercado**

Anticuerpo	Compañía	Cat n.º
Aprily-1	Alexis	ALX-804-148-C100
Aprily-2	Alexis	ALX-804-844-C100
Aprily-5	Alexis	ALX-804-801-C100
Aprily-8	Alexis	ALX-804-149-C100
Sacha-1	Alexis	ALX-804-141-C100
Sacha-2	Alexis	ALX-804-804-C100

Anticuerpo	Compañía	Cat n.º
anti CD256, clon T3-6	BioLegend	318502
anti APRIL humano de ratón	LifeSpan Biosciences	LS-C 18658
anti APRIL humano de ratón	LifeSpan Biosciences	LS-C18659
anti APRIL humano de ratón	LifeSpan Biosciences	LS-C18687
Anticuerpo monoclonal TNFSF13 (M01), clon H4-E8	Tebu-bio	H00008741-M01
Anticuerpo monoclonal TNFSF13 (M02), clon G3	(ABNOVA)	H00008741-M02
MAB APRIL/TNFSF13 humano (Clon 101115)	R and D	MAB884

Para estudiar si las características de bloqueo de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A son únicas, todos los anticuerpos anti-APRIL disponibles en el mercado conocidos se ensayaron con respecto a su capacidad para bloquear la interacción de FLAG-hAPRIL con BCMA-Fc y TACI-Fc (Figuras 3A y 3B). El bloqueo de la unión con el receptor se estudió usando un ELISA. Se recubrió una placa de ELISA con 50 con 100 µl de BCMA-Fc a 1 µg/ml o con 100 µl de TACI-Fc a una concentración de 2 µg/ml en tampón de recubrimiento y se incubó durante una noche a 4 °C. La placa se lavó después con PBS/Tween 0,2 % y después se incubó durante 1 hora a 37 °C con 100 µl de PBS/BSA 5 % por pocillo. La placa se lavó después cuatro veces con PBS/Tween 0,2 %. En una placa separada se premezclaron anticuerpos monoclonales de APRIL con sobrenadante de APRIL y se incubaron durante 30 minutos en hielo. El medio acondicionado que contenía APRIL soluble se diluyó 1 en 4 y se mezcló con un volumen igual de PBS que contenía los anticuerpos valorados en diluciones de duplicación comenzando con 5 µg/ml. Se transfirieron 100 µl de la mezcla preincubada a la placa de ELISA y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. La placa se lavó después cuatro veces con PBS/Tween 0,2 %. Después se diluyó anticuerpo anti Flag-HRP en PBS a una concentración de 1:1000 y después se añadieron 100 µl de esta a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. La placa se lavó después cuatro veces con PBS/Tween 0,2 % y después se añadieron 100 µl de ABTS a cada pocillo (el ABTS se diluyó a la relación de 10 ml de reactivo más 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> realizada inmediatamente antes de la adición). Se permitió que el color se revelara y después se leyó la DO a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se usó IgG1 humano como una proteína de control para recubrir la placa ya que este es el mismo isotipo que las proteínas de fusión de Fc y se controló con respecto a APRIL que se unía a la placa de forma no específica. Como resulta evidente a partir de la Figura 3, ninguno de los anticuerpos disponibles en el mercado fue capaz de bloquear la unión de FLAG-APRIL con TACI-Fc o BCMA-Fc, mientras que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A sí inhiben (parcialmente) la unión con TACI-Fc y BCMA-Fc.

Reactividad cruzada entre especies

También se examinó la unión de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A con APRIL de ratón mediante BIAcore, pero no se observó unión de ninguno de los anticuerpos. Los anticuerpos parecen unirse solamente a APRIL humano.

Ejemplo 3: perfiles funcionales de respuesta de linfocitos B de ratón de anticuerpos murinos anti APRIL humano a APRIL

Para mostrar que los anticuerpos de la presente invención pueden bloquear funcionalmente APRIL *in vitro*, se usaron ensayos de linfocitos B de ratón para examinar dos respuestas conducidas por APRIL en linfocitos B, proliferación y producción de IgA.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5 %. Se cultivaron esplenocitos de ratón y linfocitos B purificados en RPMI-1640 (Gibco) complementado con FCS 8 %, glutamina 2 mM y beta-mercaptoetanol a 50 µM, y se complementó con penicilina y estreptomina a una concentración de 10 µg/ml. Se aislaron linfocitos B de ratón esplénicos de ratones de tipo silvestre usando columnas de separación de células activadas magnéticas (MACS) con perlas de MACS CD45R/B220 (Miltenyi Biotec, Utrecht, Países Bajos). Las células se cultivaron en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10<sup>5</sup>/pocillo en un volumen final de 200 µl. Para todos los ensayos el medio acondicionado que contenía las diversas formas de APRIL soluble se normalizó con respecto a los niveles de expresión antes de su uso. Para medir la proliferación, las células se trataron con anti IgM (Jackson ImmunoResearch) y APRIL soluble en medio acondicionado o como proteína purificada a una concentración final de 1 µg/ml. Se añadió anticuerpo monoclonal anti Flag de reticulación al pocillo a una concentración final de 1 µg/ml. Las células se incubaron a 37 °C y después de 48 horas se pulsaron con 0,3 µCi (0,011 MBq) de timidina tritiada ([6-<sup>3</sup>H]timidina, GE Healthcare, Países Bajos) durante 18 horas, antes de la recogida. Para medir la producción de IgA, se cultivaron linfocitos B de ratón y se trataron con APRIL, como anteriormente. Después de incubación durante 6 días, se recogió sobrenadante y se ensayó con respecto a contenido de IgA por ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de ELISA con anti Ig de ratón 2 µg/ml (Southern Biotech), se bloquearon con PBS/BSA 1 % y se incubaron con el sobrenadante recogido. Se detectó después IgA unido con anti IgA de ratón marcado con HRP (Southern Biotech, Uithoorn, Países Bajos). Como control, las células se trataron con LPS 10 µg/ml (Invivogen) más TFGβ humano 1 ng/ml (Sigma-Aldrich). Como se muestra en la Figura 4A, hAPRIL.01A y en menor grado hAPRIL.03A son capaces de inhibir la recombinación de cambio de clase inducida por APRIL como se determinó por la secreción de IgA reducida a partir de linfocitos B esplénicos de ratón. TACI-Fc como control inhibió la secreción de IgA, mientras que IgG1 de ratón e Ig humano no afectaron a la secreción de IgA inducida por APRIL a partir de linfocitos B esplénicos. Además, se demostró que hAPRIL.01A y hAPRIL.03A inhibían la proliferación de linfocitos B esplénicos de ratón inducida por APRIL. Para establecer la especificidad de los anticuerpos, se estudió el efecto de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A en la secreción y la proliferación

de IgA inducida por BAFF. Como se muestra en la Figura 4B, ni hAPRIL.01A ni hAPRIL.03A inhibieron la secreción y proliferación de IgA inducida por BAFF, mientras que TACI-Fc como control inhibió ambos procesos.

#### Experimento *in vivo* para bloquear la función de APRIL

5 Para demostrar un efecto de bloqueo *in vivo* de los anticuerpos en la función APRIL, se examinó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la respuesta humoral inducida por NP-Ficolin en ratones. Los ratones usados fueron ratones transgénicos (TG) para APRIL de 8-10 semanas de edad y compañeros de camada de tipo silvestre (WT), ambos en un fondo de C57BL/6. Los ratones transgénicos para APRIL expresan APRIL humano bajo el promotor de Lck-distal, que dirige la expresión transgénica a timocitos maduros y linfocitos T periféricos (Stein *et al.*, 2002, J Clin Invest 109, 1587-1598). Los ratones se criaron en la instalación animal del Centro Médico Académico y el experimento se aprobó por el comité de ética institucional. Los ratones se dividieron en varios grupos y se trataron de la siguiente manera: se trataron cinco ratones WT para APRIL con PBS (200  $\mu$ l) y se trataron 5 grupos de cinco ratones transgénicos para APRIL con las siguientes moléculas: hAPRIL.01A o hAPRIL.03A o TACI-Fc o anticuerpo de control de subtipo coincidente mIgG1\_k (200  $\mu$ g/ratón en 200  $\mu$ l de PBS) o PBS. El tratamiento de los ratones se inició 3 días antes de la inmunización con NP-Ficolin (día 0; 100  $\mu$ l i.p. con 250  $\mu$ g del inmunógeno), las inyecciones se continuaron dos veces por semana durante 28 días. Se recogió sangre a través de vena de la cola el día -1, 3, 7, 14 y 28. Se ensayaron anticuerpos específicos anti(4-hidroxi-nitrofenacetil) (NP) (IgM, IgG e IgA) en 6 ELISA independientes usando sueros diluidos (1:100 para IgA; 1:500 para IgG y 1:2000 para IgM) como se ha descrito previamente (Hardenberg *et al*, Immunol Cell Biol, 86 (6), 530-4, (2008)). Brevemente se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner) con NP-BSA a 5  $\mu$ g/ml (Biosearch Technologies) en tampón de carbonato sódico (pH 9,6) durante una noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con BSA 1 % durante 1 hora a 37 °C y se incubaron con suero diluido durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usaron anticuerpos específicos de isotipo conjugados con HRP (IgG, IgA e IgM de cabra anti ratón, de Southern Biotech) como anticuerpos de revelado. Todas las diluciones se realizaron en PBS/BSA 1 %/Tween 20 0,05 %. Se usó un ensayo de ANOVA de una vía para comprobar la significación estadística entre los grupos TG (PBS) frente a TG (hAPRIL.01A) y TG (PBS) frente a TG (hAPRIL.03A). Como resulta evidente a partir de la Figura 5, tanto hAPRIL.01A como hAPRIL.03A inhibieron la respuesta de linfocitos B independientes de linfocitos T *in vivo*. TACI-Fc inhibió esta respuesta menos eficazmente. PBS e IgG1 de ratón como un control del mismo isotipo, no afectaron a la respuesta anti NP de IgA, IgM e IgG.

30 Para examinar el efecto a largo plazo de hAPRIL.01A y hAPRIL.03A en poblaciones de linfocitos B se trataron ratones como se ha descrito anteriormente. El día 30, los ratones se sacrificaron y el bazo y la cavidad de exudado peritoneal (PEC) se analizaron con respecto a expresión de linfocitos B por citometría de flujo. Brevemente, se separaron esplenocitos y linfocitos de la PEC a partir de glóbulos rojos por un lavado con tampón de lisis de eritrocitos y después se recontaron. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS/BSA 1 % y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$  por pocillo. A continuación, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos a las concentraciones recomendadas: B220-FITC (BD Bioscience) y CD3-APC (eBioscience); IgD-FITC (BD Bioscience) e IgM-PE (BD Bioscience); IgD-FITC (BD Bioscience), CD3-APC (eBioscience) y CD43-PE (BD Bioscience). Los anticuerpos se incubaron durante 40 minutos, se lavaron tres veces con PBS/BSA 1 % y después se analizaron por citometría de flujo usando el FACSCalibur (Becton Dickinson). Se cuantificaron linfocitos B B220<sup>+</sup>, linfocitos B maduros (IgD + IgM<sup>int</sup>) y linfocitos B T2 (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) en bazo (véase Figura 6A). Además, se cuantificaron subpoblaciones B1 (CD43<sup>+</sup>IgD<sup>int</sup>) y B2 (CD43<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) en PEC (véase Figura 6B). La reducción de linfocitos B en respuesta a tratamiento con TACI-Fc resulta evidente tanto a partir del bazo como de la PEC, lo que indica que la administración a largo plazo de TACI-Fc puede tener un efecto perjudicial en poblaciones de linfocitos B normales. Esto no se ve con anticuerpos hAPRIL.01A y hAPRIL.03A, lo que sugiere que en casos en los que la causa primaria de patología sea APRIL, pero no BAFF, los anticuerpos de la presente invención pueden mostrar menos efectos secundarios que TACI-Fc.

#### Ejemplo 4: secuencias de anticuerpos anti APRIL

##### 50 Clonación de ADNc de inmunoglobulina

Se usaron métodos basados en PCR de cebadores degradados para determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables para los anticuerpos de ratón que se expresan por hibridomas hAPRIL.01A y hAPRIL.03A. Se aisló ARN total de  $5 \times 10^6$  células de hibridomas usando TRIZOL (Invitrogen), y se sintetizaron ADNc específicos de genes para las cadenas pesadas y ligeras usando el kit de síntesis de ADNc iScript Select (Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se amplificaron por PCR usando un conjunto de cebadores de Ig basados en Novagen (Novagen, San Diego, CA) y Taq polimerasa (Invitrogen). Todos los productos de PCR que coincidían con el tamaño de amplicón esperado de 500 pb se clonaron en vector pCR4 TOPO (Invitrogen) y las construcciones se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones se exploraron por PCR de colonias usando cebadores directos e inversos M13 universales, y se seleccionaron dos clones de cada reacción para análisis de secuenciación de ADN. Las secuencias se buscaron frente a bases de datos de línea germinal y secuencias de región variable de IgV reordenadas usando NCBI Ig-Blast BLASTN 2.2.16 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>). Los resultados de Blast para hAPRIL.01A y hAPRIL.03A mostraron una secuencia de V<sub>H</sub> en fase y una secuencia de V<sub>L</sub> en fase para cada anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos se confirmaron por espectrometría de masas. Las secuencias se desvelan en el Listado de Secuencias adjunto, Figura 7 y se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3: números de ID de secuencia para anticuerpos murinos anti APRIL humano hAPRIL.01A (de la presente invención) y de hAPRIL.03A (no de acuerdo con la invención reivindicada).

SEQ ID NO:	Descripción
1	región variable de cadena pesada de hAPRIL.01A (ADN)
2	región variable de cadena ligera de hAPRIL.01A (ADN)
3	región variable de cadena pesada de hAPRIL.03A (ADN)
4	región variable de cadena ligera de hAPRIL.03A (ADN)
5	región variable de cadena pesada de hAPRIL.01A (AA)
6	región variable de cadena ligera de hAPRIL.01A (AA)
7	región variable de cadena pesada de hAPRIL.03A (AA)
8	región variable de cadena ligera de hAPRIL.03A (AA)
9	CDR1 de cadena pesada de hAPRIL.01A (AA)
10	CDR2 de cadena pesada de hAPRIL.01A (AA)
11	CDR3 de cadena pesada de hAPRIL.01A (AA)
12	CDR1 de cadena ligera de hAPRIL.01A (AA)
13	CDR2 de cadena ligera de hAPRIL.01A (AA)
14	CDR3 de cadena ligera de hAPRIL.01A (AA)
15	CDR1 de cadena pesada de hAPRIL.03A (AA)
16	CDR2 de cadena pesada de hAPRIL.03A (AA)
17	CDR3 de cadena pesada de hAPRIL.03A (AA)
18	CDR1 de cadena ligera de hAPRIL.03A (AA)
19	CDR2 de cadena ligera de hAPRIL.03A (AA)
20	CDR3 de cadena ligera de hAPRIL.03A (AA)

Ejemplo 5: mapeo de epítomos usando el método Pepscan

5

Síntesis de péptidos y exploración Pepscan

Los péptidos lineales sintéticos y CLIPS se sintetizaron y exploraron usando tarjetas PEPSCAN mini de formato tarjeta de crédito (placa de 455 pocillos con pocillos de 3 µl) como se describe en Sloodstra *et al.* (Sloodstra *et al.*, 1996, Mol. Diversity 1, 87-96) y Timmerman *et al.* (Timmerman *et al.*, 2007, J. Mol. Recognit. 20, 283-299). La unión de anticuerpos (hAPRIL.01A y hAPRIL.03A) con cada péptido se ensayó en un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN (ELISA). Las tarjetas de polipropileno de formato tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contienen los péptidos enlazados covalentemente, se incubaron con muestra (por ejemplo, anticuerpo 1 µg/ml diluido en una solución de PBS que contenía suero de caballo 5 % (v/v) y ovoalbúmina 5 % (peso/volumen)) y Tween 80 1 % (4 °C, durante una noche). Después de lavar los péptidos se incubaron con una peroxidasa anti anticuerpo (dilución 1/1000, por ejemplo peroxidasa de conejo anti ratón, Southern Biotech) (1 hora, 25 °C), y posteriormente, después de lavar se añadieron el sustrato de peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolin sulfonato (ABTS) y 2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %. Después de 1 hora se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color del ELISA se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. La preparación consiste en una cámara CCD y un objetivo de 55 mm (Sony CCD Video Cámara XC-77RR, Nikon micro-nikkor lente de 55 mm f/2,8), un adaptador de cámara (adaptador de Cámara Sony DC-77RR) y Software de Procesamiento de Imágenes.

10

15

20

Síntesis de Péptidos

25

Se sintetizaron un total de 4225 péptidos, principalmente CLIPS. La secuencia diana usada, de 147 aminoácidos, con bucles de acuerdo con el alineamiento con 1XU2.pdb subrayada:

30

RAVLTQKQKKQHSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGV  
 RIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAY NSCYSAGVFHLHQDILSVI-  
 IPRARAKLNLSPHGTFLGFVKL (SEQ ID NO: 21).

35

Bucles en el lado "superior" de la proteína: QKKQHSVLHL (SEQ ID NO: 22), ALRRGRGL (SEQ ID NO: 23), QAQGYGVRI (SEQ ID NO: 24), QDAGVYLL (SEQ ID NO: 25), SREGQGRQETV (SEQ ID NO: 26), FHLHQDILSVI (SEQ ID NO: 27) y bucles en el lado "inferior" de la proteína: INATSKDDSDVTE (SEQ ID NO: 28), VLFQDVTFTMG (SEQ ID NO: 29), IRSMPSPDRAYNSC (SEQ ID NO: 30), IPRARAKL (SEQ ID NO: 31), NLSPHGTFLGF (SEQ ID NO: 32). Las regiones de interconexión son principalmente láminas. Obsérvese que el lado "superior" e "inferior" se eligen arbitrariamente.

40

Se usaron las siguientes topologías de CLIPS: CLIPS T2 se acopla con la cadena lateral de dos cisteínas para formar una topología de un único bucle, mientras que CLIPS T3 se acopla con la cadena lateral de tres cisteínas para formar topología de doble bucle, mientras que CLIPS T2T2 primero se acopla T2 con dos cisteínas (marcadas C), y en segundo lugar se acopla T2 con dos cisteínas y finalmente CLIPS T2T3 se acopla T2 con dos cisteínas y se acopla T3 con tres cisteínas.

En total, se sintetizaron 20 conjuntos diferentes de péptidos:

- 5 191-1 (conjunto 1): se sintetizaron todas las secuencias de 35 unidades solapantes que abarcaban la secuencia diana de 147 AA completa. En este conjunto los diferentes bucles, cuando estaban presentes en la secuencia, como se ha definido anteriormente estaban restringidos en topología de doble bucle o de tipo lámina mediante dos CLIPS T2.
- 10 191-2 (conjunto 2): se identificó un total de nueve láminas. Todas las combinaciones de 9x9 se sintetizaron para imitar conformaciones de doble lámina. La secuencia GSG se usó como un enlazador.
- 15 191-3 (conjunto 3): igual que el conjunto 2 como se ha explicado anteriormente pero con una longitud de lámina más corta. 191-6 (conjunto 4) se sintetizaron todas las secuencias de 35 unidades lineales solapantes que abarcaban la secuencia diana de 147 AA completa.
- 20 191-7 (conjunto 5) Se sintetizaron todas las secuencias de 15 unidades lineales solapantes que abarcaban la secuencia diana de 147 AA completa.
- 25 191-8 (conjunto 6a) Se sintetizaron secuencias lineales cortas (de diversa longitud) que abarcaban solamente las regiones de bucle de la secuencia diana de 147 AA completa.
- 30 191-16 (conjunto 6b) Se seleccionaron diferentes péptidos de los cinco bucles "inferiores". Estos se combinaron en una matriz de 9x9 en el CLIPS T3 para formar topologías de doble bucle con bucles "inferiores" de dos longitudes diferentes.
- 35 191-17 (conjunto 7) Las 135 secuencias de 15 unidades diferentes solapantes se sintetizaron con una cisteína en la posición 1, 8 y 15. Las tres cisteínas se acoplaron con un CLIPS T3. 191-18 (conjunto 9) versiones largas de los seis bucles "superiores" y versiones largas de los cuatro bucles "inferiores" se recombinaron entre sí en el CLIPS T3.
- 40 191-19 (conjunto 10) Seis+Seis+Cuatro bucles de diferentes tamaños de la región de bucle "superior" se recombinaron todos entre sí en el CLIPS T3.
- 45 191-20 (conjunto 11, 17, 18, 19, 20). Se recombinaron 33 secuencias diferentes que abarcaban ampliamente los bucles "superiores" o "inferiores" con otro en el CLIPS T3. Estos conjuntos de péptidos están en los conjuntos 11, 17, 18, 19 y 20. La razón para esta "dispersión" es la distribución en tarjeta.
- 50 191-22 (conjunto 12) Se sintetizaron bucles de diferentes tamaños de todos los bucles "superiores" e "inferiores" como bucles individuales en CLIPS T2.
- 55 191-23 (conjunto 13) Todas las secuencias de 15 unidades de un único bucle solapantes que abarcaban la proteína diana completa se sintetizaron en CLIPS T2.
- 60 191-24 (conjunto 14). Se recombinaron seis secuencias de 9 unidades diferentes que abarcaban los bucles "superiores" con cada uno en una matriz de bucles triples 6x6x6 en combinación con CLIPS T2T3.
- 65 191-25 (conjunto 15) El mismo conjunto de péptidos solapantes que en el conjunto 1. Se sintetizaron todas las secuencias de 35 unidades solapantes que abarcaban la secuencia diana de 147AA completa. En este conjunto los diferentes bucles, cuando están presentes en la secuencia, como se ha definido anteriormente se restringieron a topología de triple bucle mediante CLIPS T3T2.
- 70 191-26 (conjunto 16). Se recombinaron seis secuencias de 9 unidades diferentes que abarcaban los bucles "inferiores" entre sí en una matriz de bucle triple 6x6x6 en combinación con CLIPS T2T3.

#### 40 Análisis de datos y determinación de epitopos

45 Cada anticuerpo se ensayó en los 4225 péptidos y se clasificaron sus valores de unión. Se consideraron candidatos a epitopos secuencias con clara reaparición en la mayoría de los de mayor unión (~ 1 % superior). Se realizaron dos análisis de apoyo adicionales. En primer lugar, se investigó si múltiples partes identificadas podían formar un epítipo discontinuo. Esto se realizó mediante la estructura homóloga 1XU2.pdb. En segundo lugar, se investigó si cada una de múltiples partes de unión identificadas se reconocía sin apoyo de la otra parte. Estos dos parámetros, colocalización en la estructura tridimensional y reconocimiento independiente, se usaron para apoyar que se identificara un epítipo conformacional y discontinuo. Para hAPRIL.01A se determinó si se unía con IRSMP SHPDRA (SEQ ID NO: 33) siendo la región central SMP SHP (SEQ ID NO: 34). Se mostró que los motivos TLFR (SEQ ID NO: 35) y/o QDVTFTMGQ (SEQ ID NO: 36) (la región central es VTFTM (SEQ ID NO: 37)) apoyaban la unión de hAPRIL.01A. Se mostró que hAPRIL.03A se unía con el motivo VSREGQGRQ (SEQ ID NO: 38), siendo la región central EGQ. Se mostró que el motivo TFTMGQ (SEQ ID NO: 39) apoyaba la unión de hAPRIL.03A.

#### 55 LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> N.V.Organon
- <120> Anticuerpos contra un ligando inductor de proliferación (APRIL)
- 60 <130> 2009.099
- <160> 39
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1
- <211> 363
- <212> ADN

ES 2 573 404 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 1

gagggtccagt tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg  
60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gaagcagaag  
120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac  
180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacagtg acttcagaca agtcctccgg cacagcctac  
240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggggcttg  
300

ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt cacogtctcc  
360

tca  
363

5

<210> 2

<211> 321

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

10

<400> 2

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc aagtccacat cagtaggaga cagggtcagc  
60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt aataatgtag cctggatatca acagaaagca  
120

gggcaatctc ctaaagcact gatttcctcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat  
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagttc  
240

gaagacttgg cagactatct ctgtcagcaa tataacatct atccattcac gttcggctcg  
300

gggacaaagt tggaaataaa a  
321

15

<210> 3

<211> 366

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 3

ES 2 573 404 T3

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcctg  
60  
acttgcttctt tctctgggtt ttcactgagc acttatggta taggagtagg ctggattcgt  
120  
cagccttcag ggaaggtctt ggagtggctg gcacacattt ggtggaatga taataagtac  
180  
tataacacag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctcaa caaccaggta  
240  
ttctcaaga tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcgaata  
300  
gctgggggta actacgacta tgctatggac cactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc  
360  
tctca  
366

5 <210> 4  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*

<400> 4

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctacat ctctctgggga gaaggtcacc  
60  
ttgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tctacctact tgtactggta ccagcagaag  
120  
ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcctt  
180  
gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag  
240  
gctgaggatg ctgcctotta tttctgcat cagtggagta gttaccacc tacgttcggt  
300  
gctgggacca agctggagct gaaa  
324

10 <210> 5  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

15 <400> 5

ES 2 573 404 T3

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

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 6

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

10

<210> 7  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 7



ES 2 573 404 T3

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

<210> 8  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 8

5

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

10

<210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 573 404 T3

<400> 9  
 Ser Tyr Val Met His 1 5

5 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 10

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ala Pro Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

10 Gly

<210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 11

Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

20 <210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 12

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Val Ala  
 1 5 10

30 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 13

Ser Ala Ser Asn Arg Asp Ser  
 1 5

35 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 14

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

45 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 15

50 Thr Tyr Gly Ile Gly Val Gly  
 1 5

<210> 16

ES 2 573 404 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 5 <400> 16  
     His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser  
                   1                  5                  10                  15  
  
 10 <210> 17  
     <211> 12  
     <212> PRT  
     <213> *Mus musculus*  
     <400> 17  
                   Ile Ala Gly Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp His  
                   1                  5                  10  
 15  
  
 20 <210> 18  
     <211> 12  
     <212> PRT  
     <213> *Mus musculus*  
     <400> 18  
                   Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr  
                   1                  5                  10  
 25  
  
 30 <210> 19  
     <211> 7  
     <212> PRT  
     <213> *Mus musculus*  
     <400> 19  
                   Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
                   1                  5  
 35  
  
 40 <210> 20  
     <211> 9  
     <212> PRT  
     <213> *Mus musculus*  
     <400> 20  
                   His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
                   1                  5  
 45  
  
 45 <210> 21  
     <211> 147  
     <212> PRT  
     <213> *Homo sapiens*  
     <400> 21

ES 2 573 404 T3

Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val Leu His  
 1 5 10 15

Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu  
 20 25 30

Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln  
 35 40 45

Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser  
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser  
 85 90 95

Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly  
 100 105 110

Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg  
 115 120 125

Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe  
 130 135 140

Val Lys Leu 145

5 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 22

Gln Lys Lys Gln His Ser Val Leu His Leu  
 1 5 10

10 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 23

Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu  
 1 5

20 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 24

Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile  
 1 5

25

ES 2 573 404 T3

<210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 25  
  
                   Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu  
                   1  5  
  
 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 26  
  
                   Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Val  
                   1  5  10  
 15  
  
 <210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
 <400> 27  
  
                   Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val  
                   1  5  10  
 25  
 <210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <400> 28  
  
                   Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu  
                   1  5  10  
 35  
 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 29  
  
                   Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly  
                   1  5  10  
 40  
 <210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 30  
  
                   Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys  
                   1  5  10  15  
 45  
  
 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 31

ES 2 573 404 T3

Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu  
1 5

5 <210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 32

Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe  
1 5 10

10 <210> 33  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
15 <400> 33

Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala  
1 5 10

20 <210> 34  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 34

Ser Met Pro Ser His Pro  
1 5

25 <210> 35  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
30 <400> 35

Thr Leu Phe Arg  
1

35 <210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
40 <400> 36

Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln  
1 5

45 <210> 37  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 37

Val Thr Phe Thr Met  
1 5

50 <210> 38  
<211> 9  
<212> PRT

ES 2 573 404 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln  
1 5

5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 39

Thr Phe Thr Met Gly Gln  
1 5

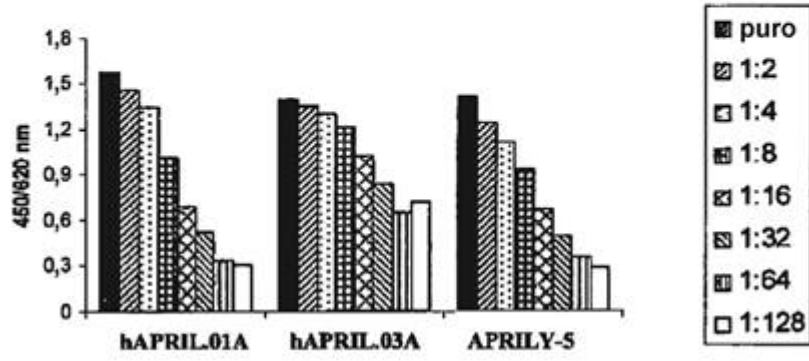
**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de unión seleccionado de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con APRIL humano que comprende:
- 5 a) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 10 y 11 respectivamente, o una variante de cualquiera de dichas secuencias que comprende hasta tres modificaciones de aminoácidos; y
- 10 b) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13 y 14 respectivamente, o una variante de cualquiera de dichas secuencias que comprende hasta tres modificaciones de aminoácidos,
- en el que el compuesto de unión se une con el epítipo de APRIL humano conformacional SMPSPH, y preferentemente con IRSMPSPHDPRA, y en el que el compuesto de unión bloquea completamente la unión de APRIL con TACI humano y bloquea al menos parcialmente la unión de APRIL con BCMA humano.
- 15 2. El compuesto de unión de la reivindicación 1, comprendiendo dicho compuesto de unión una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 20 3. El compuesto de unión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto de unión bloquea completamente la unión de APRIL humano con BCMA humano.
4. El compuesto de unión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto de unión:
- 25 a) se une con APRIL humano con una  $K_D$  de 10 nM o menos; y
- b) bloquea la unión de TACI humano y/o BCMA humano con APRIL humano con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 2 nM o menos.
- 30 5. El compuesto de unión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto de unión es:
- a) un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo;
- b) un anticuerpo humano o un fragmento del mismo;
- 35 c) un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo; o
- d) un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, mAb específico y un diacuerpo.
6. El compuesto de unión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto de unión inhibe la proliferación y supervivencia de linfocitos B.
- 40 7. Un polinucleótido aislado que codifica el compuesto de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 7.
- 45 9. Un método para producir un compuesto de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende:
- a) cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7 en medio de cultivo en condiciones en las que el polinucleótido se expresa, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y
- 50 b) recuperar los polipéptidos de la célula hospedadora o del medio de cultivo.
10. Una composición que comprende el compuesto de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 55 11. Compuesto de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en terapia.
12. Compuesto de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en:
- 60 a) tratamiento de cáncer;
- b) tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria; o
- c) tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
13. El compuesto de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en un método de diagnóstico *in vivo*.
- 65 14. Uso de un compuesto de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un método de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro*.



Figura 1.

**A. ELISA de anti-FLAG + FLAG-APRIL**



**B.**

**Bloqueo de FG-APRIL con BCMA-Fc adsorbido**

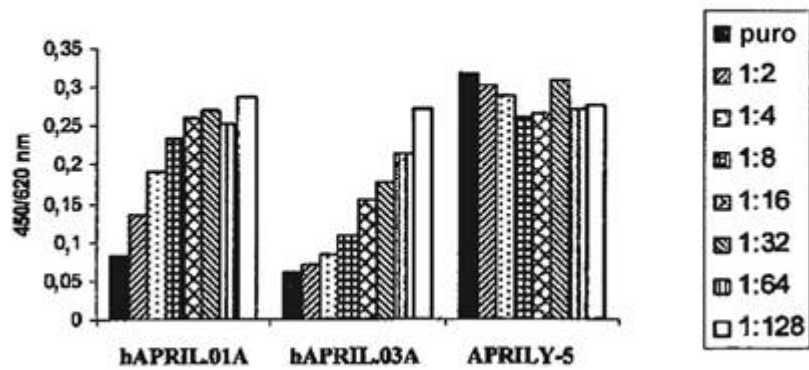


Figura 2.

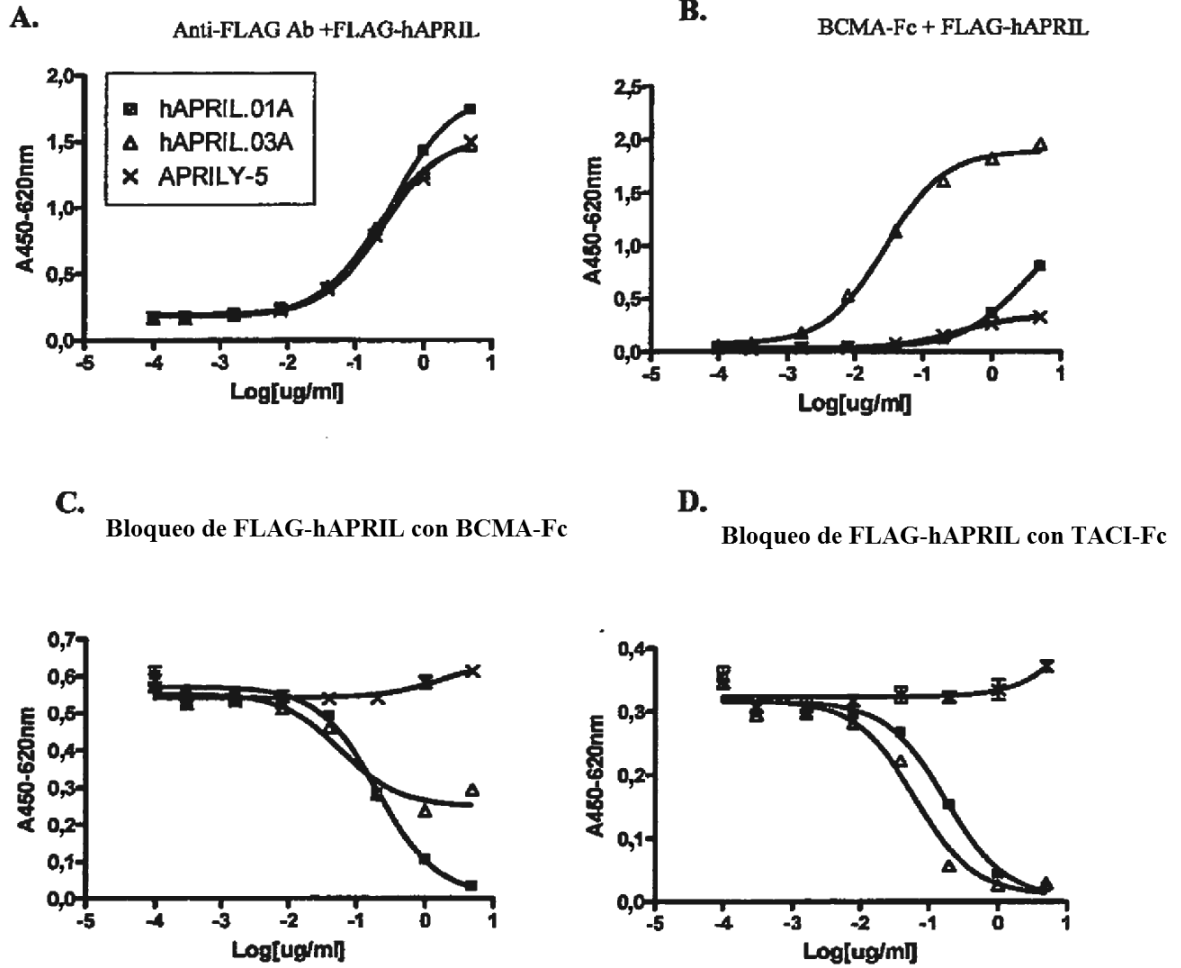


Figura 3.

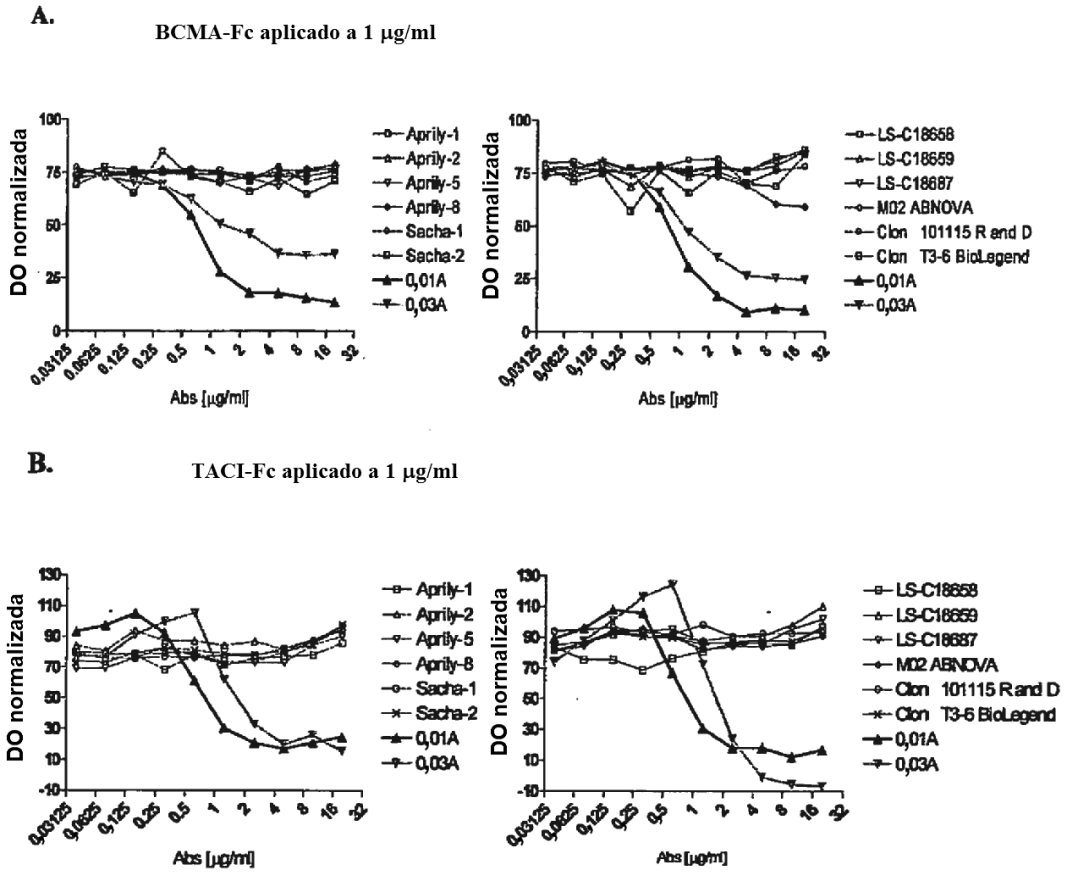
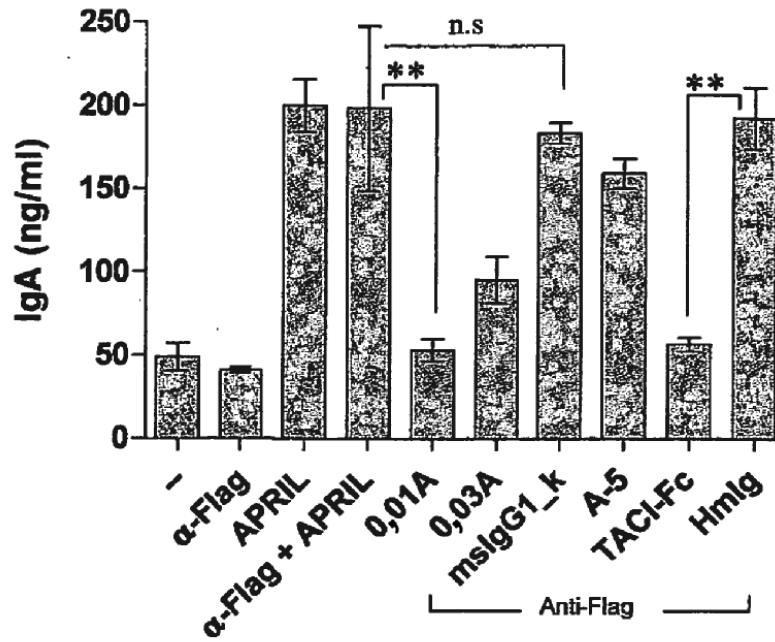


Figura 4. A

Medio que contiene APRIL (diluido 1:4)



Medio que contiene APRIL (diluido 1:4)

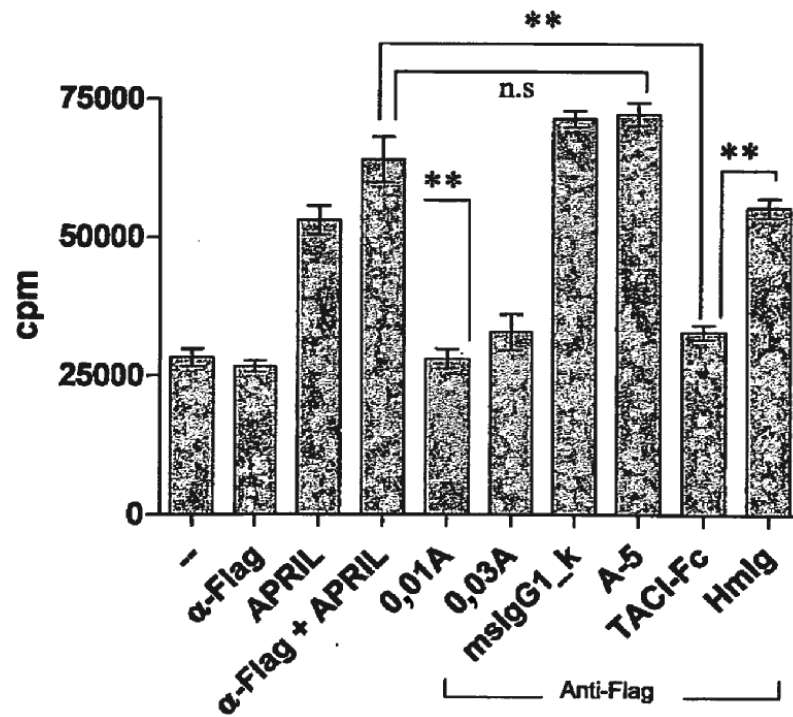


Figura 4. B

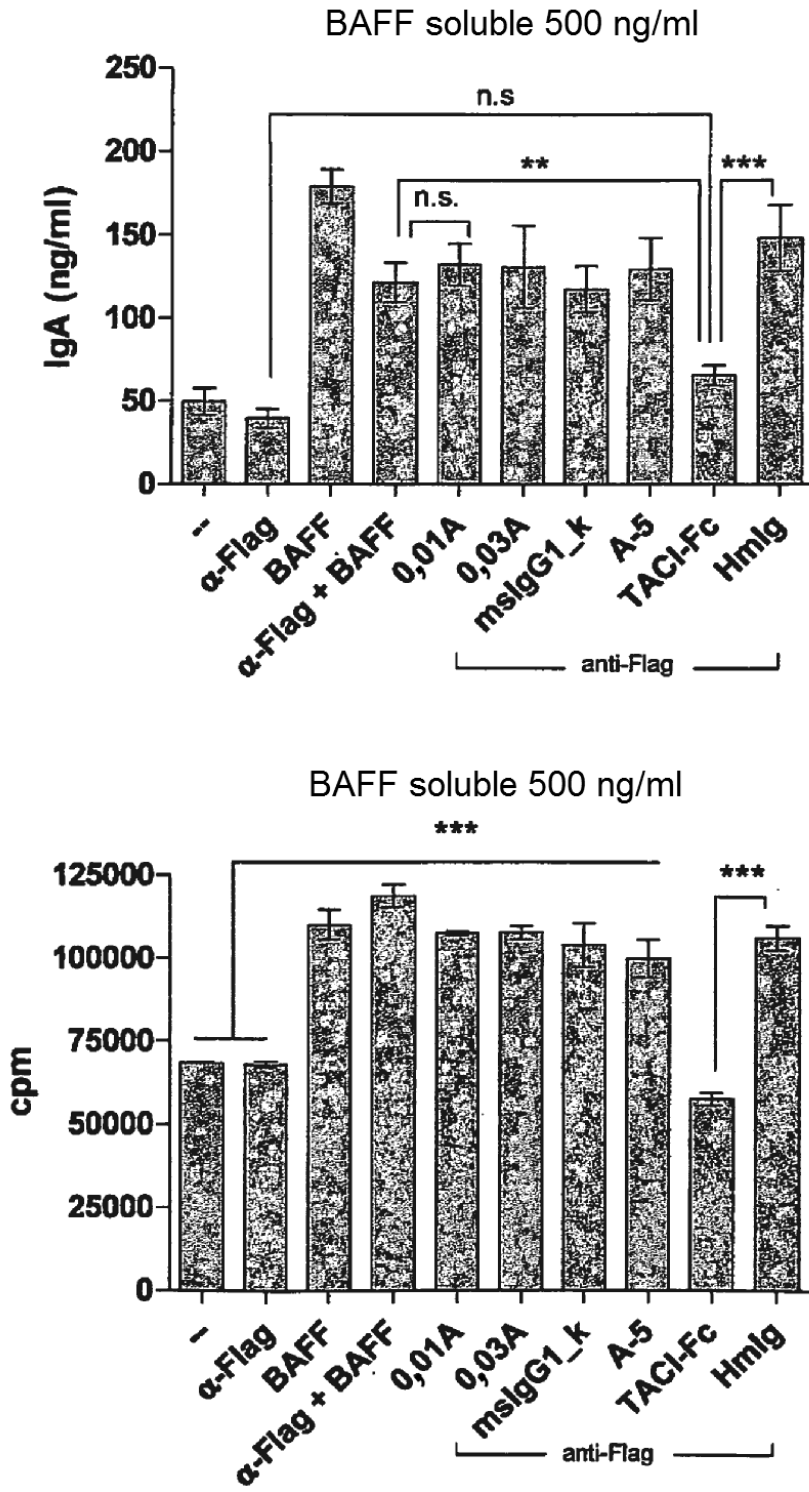


Figura 5. A

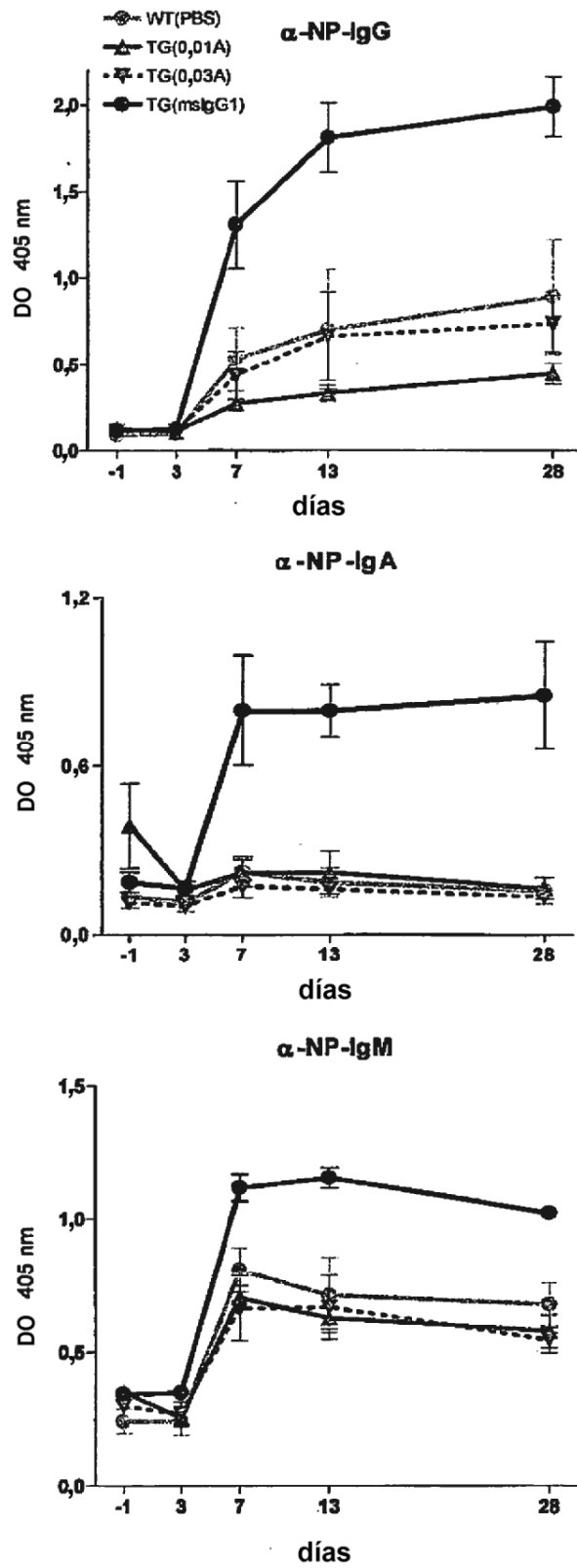


Figura 5. B

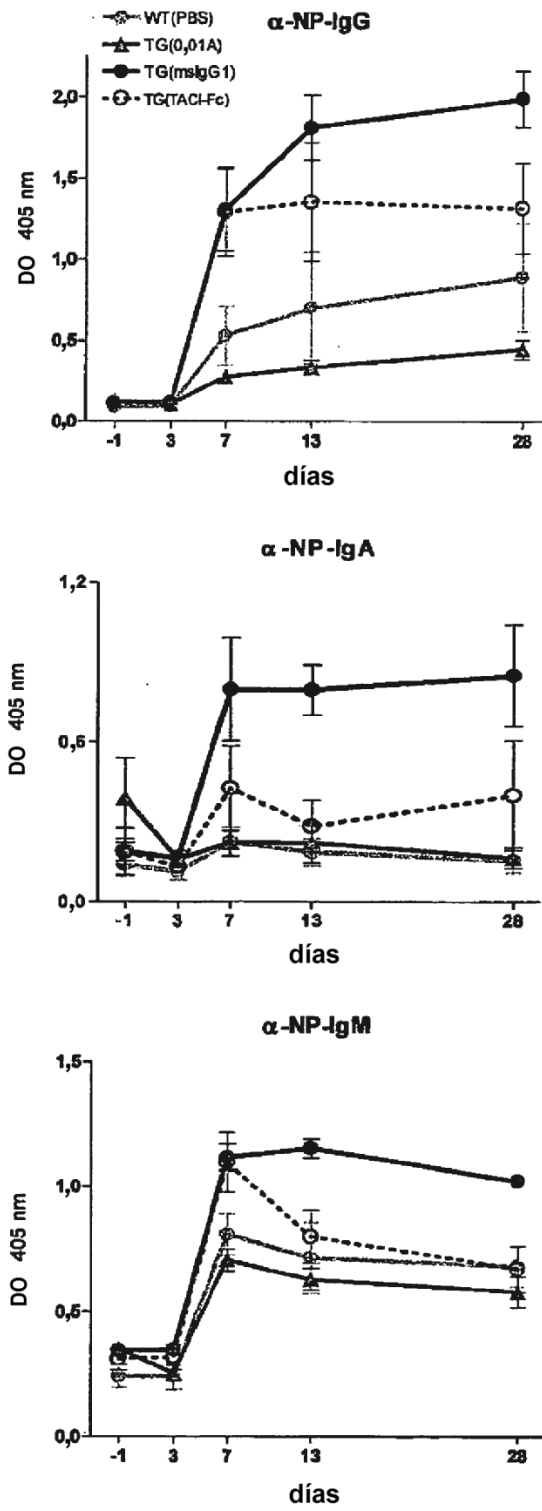


Figura 6. A

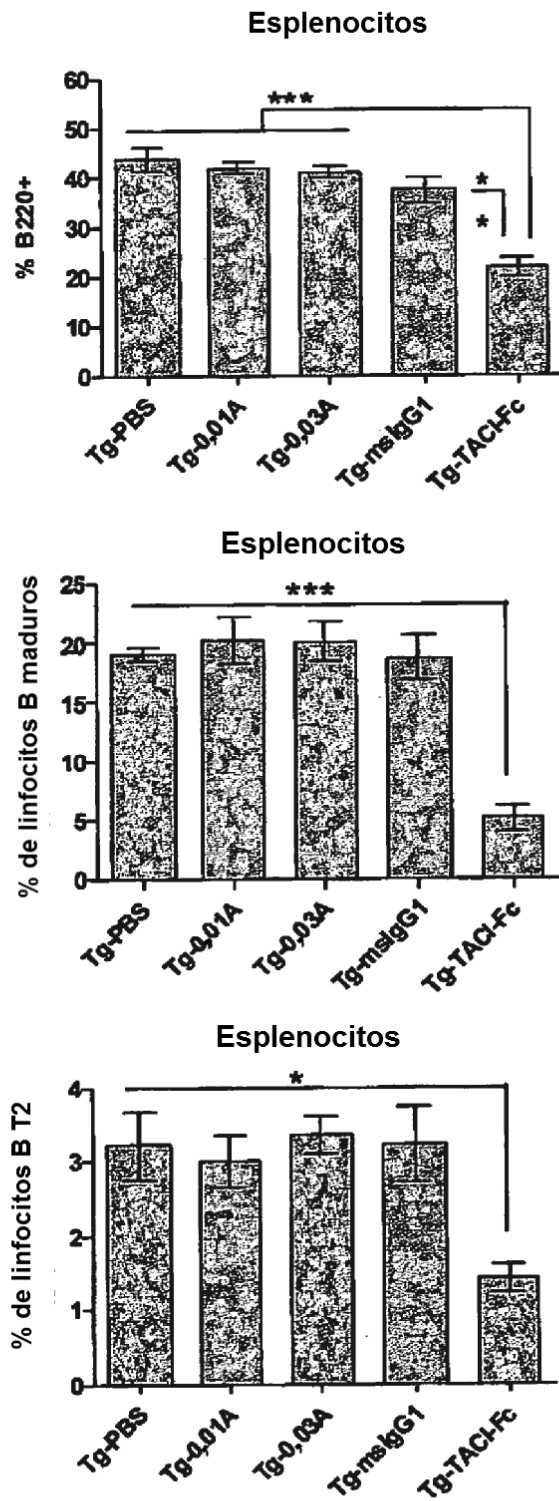
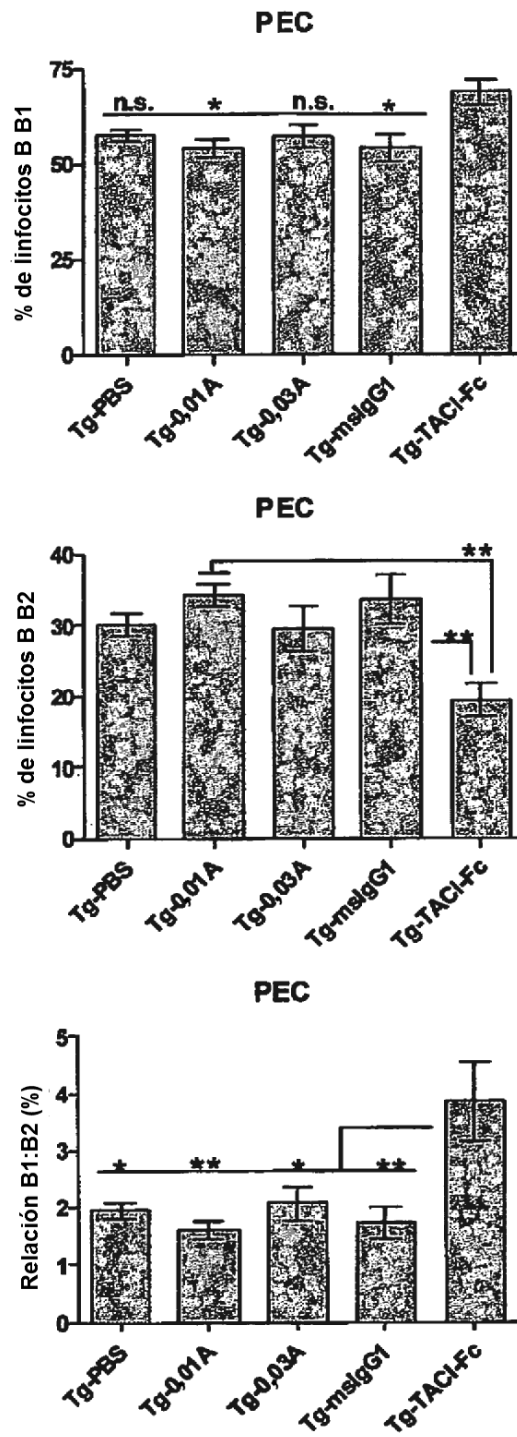




Figura 6. B



**Figura 7**

**A.**

**hAPRIL.01A Cadena pesada**

<-----FWR1-----> <CDR1> <----FWR2----> <-----CDR2----->  
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT SYVMH WVKQKPGQGLEWIG YINPYNDAPKYNEKFKG

<-----FWR3-----> <---CDR3---> <---FWR4--->  
 KATVTSKSSGTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR GLGYALYYAMDY WGQGTSVTVSS

**B.**

**hAPRIL.01A Cadena ligera**

<-----FWR1-----> <---CDR1---> <----FWR2----> <-CDR2->  
 DIVMTQSQKFKSTSVGDRVSVTC KASQNVGNVA WYQQKAGQSPKALIS SASNRDS

<-----FWR3-----> <--CDR3-> <---FWR4--->  
 GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYNIYPFT FSGSGTELEIK

**C.**

**hAPRIL.03A Cadena pesada**

<-----FWR1-----> <-CDR1-> <----FWR2----> <-----CDR2----->  
 QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLS TYGIGVG WIRQPSGKGLEWLA HIWWNDNKYYNTALKS

<-----FWR3-----> <---CDR3---> <---FWR4--->  
 RLTISKDTSNNQVFLKIASVDTADTATYYCAR IAGGNYDYAMDH WGQGTSVTVSS

**D.**

**hAPRIL.03A Cadena ligera**

<-----FWR1-----> <---CDR1---> <----FWR2----> <-CDR2->  
 QIVLTQSPAIMSTSPGKVTITC SASSVSSTYLY WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS

<-----FWR3-----> <--CDR3-> <---FWR4--->  
 GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEEDAASYFC RQWSSYPPT FGAGTKLELK