

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 526**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009** **E 09739435 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2291657**

54 Título: **Concentraciones séricas de heterotrímeros BLYS/APRIL y su uso en métodos diagnósticos**

30 Prioridad:

01.05.2008 US 49706

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

27.07.2016

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC (100.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, WA 98102-3702, US**

72 Inventor/es:

**DILLON, STACEY, R. y
HARDER, BRANDON, J.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 578 526 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

Concentraciones séricas de heterotrímeros BLYS/APRIL y su uso en métodos diagnósticos

5 **Antecedentes de la invención**

Las interacciones celulares que tienen lugar durante una respuesta inmunitaria son reguladas por miembros de varias familias de receptores de superficie celular, incluyendo la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La familia del TNFR consiste en varios receptores glicoproteína de membrana integrales, muchos de los cuales, junto con sus respectivos ligandos, regulan interacciones entre diferentes linajes celulares hematopoyéticos (Smith *et al.*, The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation and Death, 76:959-62, 1994; Cosman, Stem Cells 12:440-55, 1994). Tres miembros de receptores de esta familia son (1) BCMA, antígeno de maduración de linfocitos B (Gras *et al.*, Int. Immunol. 17:1093-106, 1995 y Hatzoglou *et al.*, J. Immunol., 165: 1322-30, 2000); (2) TACI, factor de interacción entre el activador transmembrana y CAML (von Bülow and Bram, Science 228:138-41, 1997 y la publicación de la OMPI WO 98/39361)) y (3) BAFF-R, también conocido como receptor de BAFF/BLYS 3 (BR3), (Thompson *et al.*, Science, 293:2108-11, 2001). Estos receptores se sabe que se unen a uno o ambos ligandos del TNF – Estimulador de los linfocitos B (BAFF también conocido como BLYS, TALL-1, ztnf4 y THANK) (ver, por ejemplo, Shu *et al.*, J. Leukoc. Biol. 65: 680-683 (1999)) y un ligando inductor de la proliferación (APRIL) (véase, por ejemplo, Hahne *et al.*, J. Exp. Med. 188: 1185-1190 (1998)). En concreto, se sabe que TACI y BCMA se unen ambos a BLYS y APRIL y BAFF-R se une sólo a BLYS.

Se han desarrollado varios antagonistas de BLYS y/o APRIL con el fin de bloquear la unión de los ligandos a los miembros de los receptores de la familia, con el fin de bloquear los resultados de esta unión que incluyen, pero no deben limitarse a la co-estimulación de linfocitos B, la supervivencia del plasmablasto y de las células plasmáticas, el cambio de clase de Ig, el aumento de la función de las células presentadoras de antígeno a los linfocitos B, la supervivencia de linfocitos B malignos, el desarrollo de linfocitos B más allá de la etapa T-1 y la formación completa del centro germinal. Algunas de estas moléculas también pueden unirse a y bloquear el efecto de APRIL sobre los linfocitos B y otros componentes del sistema inmunitario (Dillon *et al.* (2006) Nat. Rev. Drug Dis. 5, 235-246). Las moléculas que se han desarrollado para afectar a la función de los linfocitos B interfiriendo con BLYS y/o APRIL incluyen anticuerpos contra BLYS como LymphoStat-B (belimumab) (Baker *et al.*, (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253-3265 y el documento WO 02/02641); proteínas de fusión del dominio extracelular del receptor/dominio FC, tales como TACI-Ig, incluyendo una realización particular, ataccept (solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 20060034852), BAFF-R-Fc (WO 05/0000351) y BCMA-Ig u otras proteínas de fusión que usan los dominios extracelulares del receptor. Una clase adicional de antagonistas de BLYS y/o APRIL incluyen otras moléculas que dependen de la capacidad de unión a BLYS para bloquear la unión a sus receptores, tales como AMG 623, anticuerpos contra el receptor y otras moléculas divulgadas en los documentos WO 03/035846 y WO 02/16312.

Un aspecto poco estudiado de esta familia de ligando/receptor es el hecho de que estos ligandos parecen existir in vivo no sólo como homotrímeros (lo cual se esperaría para ligandos de la familia TNF), sino también como heterotrímeros (HT) BLYS/APRIL de estequiometría no caracterizada. El uso de un conjunto de muestras extremadamente pequeñas y heterogéneas (es decir, 15 pacientes con 6 diferentes diagnósticos de enfermedades autoinmunitarias entre ellos), Roschke *et al.* (J. Immunol.169: 4.314 a 4.321, 2002) describieron la existencia de cantidades elevadas de HT en el suero, en comparación con los controles sanos. Sin embargo, no ha habido ninguna asociación entre la presencia de HT elevados y una enfermedad autoinmunitaria en particular, un análisis necesario para aplicar estos hallazgos a los métodos de tratamiento de enfermedades específicas, ni se ha presentado este hallazgo más allá de manera anecdótica, es decir, con significación estadística.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de investigación de la actividad biológica de los HT y el desarrollo de un ensayo para comparar las concentraciones de HT nativos con las de BLYS y APRIL homotrímicos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias. Además, este ensayo permite la identificación de patrones de expresión de HT de modo que puedan identificarse las asociaciones estadísticas con enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematoso sistémico (LES). Esta información es importante para la identificación de las personas que tienen una propensión hacia el desarrollo de este tipo de enfermedades autoinmunitarias, se encuentran en un estado de enfermedad activa y para identificar a aquellos que responderán favorablemente al tratamiento con antagonistas de BLYS y/o APRIL de estas enfermedades. La presente memoria describe las concentraciones de HT asociadas a enfermedades autoinmunitarias y proporciona pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de este patrón de expresión, a saber, el aumento de las concentraciones en suero de HT en los que sufren enfermedades autoinmunitarias, tales como el lupus eritematoso sistémico, en comparación con las concentraciones observadas en los controles sanos.

Roschke V *et al.*, J. Immunology, Vol. 169, 1 de enero de 2002, páginas 4314-4321, señalan que BLYS y APRIL forman heterotrímeros biológicamente activos que se expresan en pacientes con enfermedades reumáticas inmunitarias.

Malin V Jonsson *et al.*, J. Clin. Immunology, Vol. 25(3), 1 de mayo de 2005, páginas 189-201, señalan que existe una asociación entre las concentraciones circulantes de APRIL y BAFF y la organización linfoide primaria en el

Síndrome de Sjögren primario.

Daridon *et al.*, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 7(4), 1 Febrero de 2008, páginas 267-271, describe BAFF, APRIL y TWE-PRIL.

Seyler Thorsten M *et al.*, *J. Clin. Investigation*, Vol. 115(11), Noviembre de 2005, páginas 3083-3092, describe BLYS y APRIL en la artritis reumatoide.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la detección de concentraciones de HT en el suero y en otras muestras biológicas. Como se ha demostrado que concentraciones elevadas de HT están significativamente asociadas a la enfermedad autoinmunitaria, tal como la AR, esta medición es útil como un ensayo de diagnóstico. Tales ensayos de diagnóstico son útiles para predecir la probabilidad de un individuo de tener una afección asociada a la actividad autoinmunitaria, tal como el LES. La descripción se refiere además a determinar un tratamiento apropiado para un individuo con LES.

La detección de elevadas concentraciones de HT en el suero de pacientes que presentan actividad autoinmunitaria, tal como en el LES, permite la selección del plan de tratamiento que es más probable que sea eficaz en el tratamiento de la afección. Estos planes de tratamiento por lo general implican el uso de antagonistas de BLYS y/o APRIL, ya sea solos o en combinación con otro fármaco, tal como un fármaco inmunosupresor (como MMF o Cellcept®) o un antagonista de CD20 (como Rituxan®).

Por lo tanto, la divulgación se refiere además al tratamiento de un individuo con un diagnóstico clínico reciente de LES, que comprende generalmente la detección de elevadas concentraciones de HT en el suero, en comparación con las concentraciones observadas en el suero de controles sanos. La detección de elevadas concentraciones de HT en el suero permite predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico específico que comprende antagonistas de BLYS y/o APRIL. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a antagonistas de BLYS y/o APRIL (ya sea solos o en combinación con otros fármacos) durante el tratamiento del LES, como se define en las reivindicaciones.

Muy específicamente, la presente memoria describe un método de detección de concentraciones elevadas de HT en el suero de un individuo que comprende medir una primera concentración de las concentraciones de proteína HT en una muestra biológica y comparar esa concentración con una segunda concentración de las concentraciones de proteína HT presente en una muestra biológica de un individuo sano y determinar si la primera concentración se incrementa en comparación con la segunda concentración, en el que dicho aumento de las concentraciones de proteína HT está asociado a una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad autoinmunitaria puede ser seleccionada de entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica (NL), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren y glomerulonefritis. En los métodos de la invención, la enfermedad autoinmunitaria es el lupus eritematoso sistémico.

La presente memoria describe un método de tratamiento de un individuo clínicamente diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria, que comprende analizar una muestra biológica de un individuo clínicamente diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria para determinar la presencia o ausencia de concentraciones elevadas de HT en el suero, en el que la presencia de concentraciones elevadas de HT está asociada al diagnóstico clínico de la enfermedad autoinmunitaria y seleccionar el plan de tratamiento más eficaz para las personas clínicamente diagnosticadas con una afección asociada a concentraciones elevadas de HT. El plan de tratamiento puede implicar la administración de un antagonista de BLYS. Y, en una realización preferida, dicho antagonista de BLYS también puede ser un antagonista de APRIL. En particular, el plan de tratamiento debe implicar la administración de un antagonista del HT. Para este método, la enfermedad autoinmunitaria puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica (NL), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren y glomerulonefritis. En los métodos de la invención, la enfermedad autoinmunitaria es el lupus eritematoso sistémico.

La presente invención describe métodos in vitro (tal como se define en las reivindicaciones) para predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico para el LES, que comprende determinar la concentración de HT en el suero, en el que la presencia de concentraciones elevadas de HT es predictivo de la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico para el LES. Además, en la presente invención el tratamiento farmacológico puede implicar la administración de un antagonista del HT, que también puede ser un antagonista de BLYS y/o APRIL.

La presente invención se refiere a un método in vitro de detección de concentraciones elevadas de HT en el suero

de un individuo, que comprende medir la concentración de las concentraciones de HT en una muestra biológica de ensayo del individuo; comparar dicha concentración con las concentraciones de HT en una muestra biológica de un control sano y determinar si la concentración de las concentraciones de HT en la muestra biológica de ensayo se incrementa en comparación con la concentración en la muestra de control; en el que dichas concentraciones incrementadas de TH se relacionan con el LES.

La presente memoria descriptiva describe un método in vitro de selección del plan de tratamiento más eficaz para el tratamiento de un individuo clínicamente diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria, que comprende analizar in vitro una muestra biológica de un individuo clínicamente diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria para determinar la presencia o ausencia de concentraciones elevadas de HT en su suero, en el que la presencia de concentraciones elevadas de HT está asociada al diagnóstico clínico de la enfermedad autoinmunitaria. Para este método, el plan de tratamiento puede implicar el uso de un antagonista del HT y el antagonista HT también puede ser un antagonista de BLYS y/o APRIL. La enfermedad autoinmunitaria puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica (NL), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörgren y glomerulonefritis. En particular, la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.

En una realización adicional, la presente invención incluye un método in vitro (tal como se define en las reivindicaciones) para predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico para el LES, que comprende determinar la concentración de las concentraciones de HT en una muestra del paciente; en el que la presencia de concentraciones elevadas de HT es predictiva de la probabilidad que tiene el paciente para responder a un tratamiento farmacológico para el LES.

El tratamiento farmacológico puede comprender un antagonista del HT y dicho antagonista del HT también puede ser un antagonista de BLYS y/o APRIL.

Por último, la presente memoria se describe un antagonista de BLYS para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente, en el que dicho paciente tiene concentraciones elevadas de las concentraciones de HT en el suero. El antagonista también puede ser una proteína de fusión del dominio extracelular del receptor/dominio Fc seleccionada de TACI-Ig y BCMA-Ig. En particular, la proteína de fusión del dominio extracelular del receptor/dominio Fc puede ser TACI-Ig, tal como atacicept.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de los detalles de la invención como se describe más detalladamente a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de dispersión de las concentraciones de heterotrímico de una cohorte de pacientes diagnosticados con LES o AR, así como de controles sanos.

La FIG. 2 expresa los datos de la FIG. 1 que muestra las concentraciones promedio de heterotrímico.

La FIG. 3 representa gráficamente las concentraciones de heterotrímico de una segunda cohorte de pacientes con LES.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método in vitro (tal como se define en las reivindicaciones) para la detección de las concentraciones de HT en muestras de suero y el uso de esta información para predecir la presencia de LES y predecir la probabilidad de que un paciente responda a un tratamiento con un antagonista del HT. La invención se basa en el hallazgo de que las concentraciones de las concentraciones de HT en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunitarias son estadísticamente elevadas. Los antagonistas del HT (que también pueden ser antagonistas de BLYS y/o APRIL) neutralizan selectivamente la producción de inmunoglobulinas autoinmunitarias y otras citocinas destructivas de tejido por las células inmunitarias, tales como linfocitos B, de dichos pacientes. Esta observación permite el desarrollo de ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de concentraciones elevadas de HT donde estas concentraciones más elevadas se asocian a la enfermedad autoinmunitaria, tal como el LES y también puede predecir la probabilidad de que un individuo responda correctamente a métodos de tratamiento que neutralizan la acción de células inmunitarias reactivas, tales como linfocitos B, es decir, antagonistas del HT (antagonistas de BLYS y/o APRIL).

Antes de describir la presente invención, se ha de entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, las cuales, por supuesto, varían. También se entiende que la terminología usada en la presente memoria solamente tiene el objetivo de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el

mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

5 Hay que señalar que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un, una”, y “el, la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un polimorfismo” incluye una pluralidad de tales polimorfismos, la referencia a “una molécula de ácido nucleico” incluye una pluralidad de tales moléculas de ácido nucleico y la referencia a “el método”
10 incluye la referencia a uno o más métodos, etapas del método y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc.

15 Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, las cuales pueden tener que ser confirmadas de forma independiente.

20 Definiciones

El término heterotrímero (HT), tal como se usa en la presente memoria abarca multímeros de tres subunidades de ligando, donde cada subunidad de ligando es o BLYS o APRIL y al menos una subunidad es BLYS y al menos una subunidad es APRIL. Por lo tanto, “HT” incluye aquellas moléculas que son dos de BLYS y una de APRIL, así como aquellas que son dos de APRIL y una de BLYS.

25 El término “polimorfismo”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una diferencia en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de una región dada, en comparación con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en una región homóloga de otra persona, en particular, una diferencia en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de una región determinada que difiere entre individuos de la misma especie. Un polimorfismo se define en general en relación con una secuencia de referencia. Los polimorfismos incluyen diferencias en nucleótidos individuales, diferencias en la secuencia de más de un nucleótido y las inserciones, inversiones y deleciones de nucleótidos individuales o múltiples nucleótidos; así como las diferencias en aminoácidos individuales, diferencias en la secuencia de más de un aminoácido y las inserciones, inversiones y deleciones de aminoácidos
35 individuales o múltiples aminoácidos.

Los términos “polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término “polinucleótido” incluye moléculas helicoidales de cadena única, doble y triple. “Oligonucleótido” se refiere generalmente a polinucleótidos de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 nucleótidos de ADN de cadena sencilla o de doble cadena. Sin embargo, para los fines de esta divulgación, no hay límite superior para la longitud de un oligonucleótido. Los oligonucleótidos también se conocen como oligómeros u oligos y se pueden aislar de genes, o sintetizarse químicamente por métodos conocidos en la técnica.

45 Las siguientes son realizaciones de polinucleótidos no limitantes: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Una molécula de ácido nucleico puede comprender también moléculas de ácido nucleico modificadas, tales como moléculas de ácido nucleico metilado y análogos de moléculas de ácido nucleico. Los análogos de purinas y pirimidinas son conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos pueden ser de origen natural, por ejemplo, ADN o ARN, o pueden ser análogos sintéticos, como se conoce en la técnica. Tales análogos pueden ser los preferidos para su uso como sondas debido a su estabilidad superior en condiciones de ensayo. Se ha demostrado que las modificaciones en la estructura nativa, incluidas las modificaciones en la cadena principal, azúcares o bases heterocíclicas, aumentan la estabilidad intracelular y la afinidad de unión. Entre los cambios útiles en la química de la cadena principal se encuentran los fosforotioatos; fosforoditioatos, donde ambos oxígenos que no forman puente están sustituidos con azufre; fosforamiditas; fosfotriésteres de alquilo y boranofosfatos. Los derivados de fosfato
50 quirales incluyen 3'-O'-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforamidato. Los ácidos nucleicos peptídicos sustituyen a toda la cadena principal de ribosa fosfodiéster con un enlace peptídico.

60 Para aumentar la estabilidad y la afinidad también se usan modificaciones de azúcar. Se puede usar el α -anómero de desoxirribosa, donde la base está invertida con respecto al β -anómero natural. El 2'-OH del azúcar ribosa puede alterarse para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo, que proporcionan resistencia frente a la degradación sin comprometer la afinidad.

65 La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener el apareamiento de bases adecuado. Algunas

sustituciones útiles incluyen desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Se ha demostrado que la 5-propinil-2'-desoxiuridina y la 5-propinil-2'-desoxicitidina aumentan la afinidad y la actividad biológica cuando se sustituyen por desoxitimidina y desoxicitidina, respectivamente.

5 Los términos “polipéptido” y “proteína”, usados indistintamente en la presente memoria, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos química o bioquímicamente modificados o derivatizados y polipéptidos que tienen cadenas principales de péptidos modificados. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina N-terminal; proteínas inmunológicamente etiquetadas y similares.

En el sentido más amplio, tal como se usa en la presente memoria, la expresión “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una enfermedad en la que el sistema inmunitario de un paciente está produciendo una respuesta autoinmunitaria no deseada a una o más de sus propias proteínas. Ejemplos representativos de enfermedades autoinmunitarias incluyen artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica (NL), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörgren y glomerulonefritis.

Un polinucleótido “sustancialmente aislado” o “aislado” es uno que está sustancialmente libre de las secuencias con las que está asociado en la naturaleza. Por sustancialmente libre se entiende al menos 50 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 % e incluso más preferiblemente al menos 90 % libre de los materiales con los que está asociado en la naturaleza. Como se usa en la presente memoria, un polinucleótido “aislado” también se refiere a polinucleótidos recombinantes, que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no están asociadas a todo o una porción de un polinucleótido al que está asociado en la naturaleza, (2) están unidos a un polinucleótido distinto de aquel al que está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza.

Las reacciones de hibridación pueden llevarse a cabo en condiciones de diferente “rigurosidad”. Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son ampliamente conocidas y están publicadas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989). Ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden creciente de rigurosidad): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C y 68 °C; concentraciones de tampón de 10 x SSC, 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC (donde SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM) y sus equivalentes usando otros sistemas tampón; concentraciones de formamida de 0 %, 25 %, 50 % y 75 %; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas; 1, 2, o más etapas de lavado; tiempos de incubación de 1, 2, o 15 minutos y soluciones de lavado de 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC, o agua desionizada. Ejemplos de condiciones rigurosas son hibridación y lavado a 50 °C o superior y en 0,1 x SSC (NaCl 9 mM/citrato de sodio 0,9 mM).

“T_m” es la temperatura en grados Celsius a la que el 50 % de un dúplex de polinucleótidos compuesto de hebras complementarias unidas por hidrógeno en dirección anti-paralela por apareamiento de bases de Watson-Crick se disocian en cadenas simples en las condiciones del experimento. T_m se puede predecir según una fórmula estándar, tal como: donde [X⁺] es la concentración de cationes (normalmente ión sodio, Na⁺) en mol/l; (% G/C) es el número de residuos G y C como porcentaje de los residuos totales en el dúplex; (% F) es el porcentaje de formamida en la solución (peso/vol) y L es el número de nucleótidos en cada hebra del dúplex.

Las condiciones rigurosas, tanto para la hibridación de ADN/ADN como de ADN/ARN son como se describen por Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, Incorporada aquí por referencia. Por ejemplo, véase la página 7.52 de Sambrook *et al.*

50 El término “célula hospedadora” incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de cualquier vector(es) recombinante o un polinucleótido aislado de la invención. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una única célula hospedadora y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o complementaria total en ADN) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula hospedadora incluye células transfectadas o infectadas in vivo o in vitro con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Una célula hospedadora que comprende un vector recombinante de la invención es una “célula hospedadora recombinante”.

El término “se une específicamente”, en el contexto de la unión del anticuerpo, se refiere a la unión de alta avidez y/o afinidad de un anticuerpo a un polipéptido específico es decir, un epítipo de un polipéptido APRIL o BLYS polimórfico. La unión del anticuerpo a un epítipo de un polipéptido APRIL o BLYS específico es preferiblemente más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítipo, particularmente aquellos que pueden estar presentes en moléculas en asociación con, o en la misma muestra, que el polipéptido específico de interés, por ejemplo, se une más fuertemente a un epítipo APRIL o BLYS específico que a un epítipo APRIL o BLYS diferente, de manera que ajustando las condiciones de unión, el anticuerpo se une casi exclusivamente al epítipo APRIL o BLYS específico y no a cualquier otro epítipo APRIL o BLYS. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de interés pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos a un nivel débil, pero detectable (por

ejemplo, 10 % o menos de la unión mostrada al polipéptido de interés). Dicha unión débil, o unión de fondo, es fácilmente discernible de la unión del anticuerpo específico al compuesto o polipéptido de interés, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados. En general, los anticuerpos de la invención que se unen a un polipéptido APRIL o BLYS específico con una afinidad de unión de 10^7 mol/l o más, preferiblemente 10^8 mol/l o más se dice que se unen específicamente al polipéptido APRIL o BLYS específico. En general, un anticuerpo con una afinidad de unión de 10^6 moles/litros o menos no es útil, ya que no se unirá a un antígeno a un nivel detectable usando la metodología convencional que se utiliza actualmente.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en comparación con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que son sintetizados mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ej., la patente US-4.816. 567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente US-4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los métodos para fabricar anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica.

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

En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (RDC) del receptor se sustituyen por residuos de una RDC de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (RM) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la RDC o marco importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones RM son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones RM pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la RM son generalmente no más de 6 en la cadena H y en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZADO en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por inmunización de monos macacos con el antígeno de interés. Métodos de fabricación de anticuerpos humanizados son conocidos en la técnica.

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

"Fragmentos funcionales" de los anticuerpos de unión de la invención son aquellos fragmentos que retienen la unión

a BlyS, TACI, BAFF-R o BCMA con sustancialmente la misma afinidad que la molécula de cadena completa intacta del que se derivan y pueden ser capaces de agotar linfocitos B, tal como se mide mediante ensayos in vitro o in vivo, tales como los descritos en la presente memoria.

5 “Funciones efectoras” del anticuerpo se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ej., receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

15 “Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos” o “CCDA” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ej., linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula que lleva un antígeno diana y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células primarias para mediar la CCDA, los linfocitos citolíticos naturales (NK), expresan FcyRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcyRI, FcyRII y FcyRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de CCDA de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de CCDA in vitro, tal como el descrito en la Patente US-5.500.362 o US-5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad CCDA de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ej., en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *PNAS* (USA) 95:652-656 (1998).

25 La “citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ej., como el descrito en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

35 Un anticuerpo “aislado” es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno 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 realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry y más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata.

40 El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

45 La expresión “anticuerpo marcado de manera detectable” se refiere a un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo que retiene la especificidad de unión para un polipéptido APRIL o epítipo) que tiene un marcador detectable unido. El marcador detectable normalmente se une por conjugación química, pero cuando el marcador es un polipéptido, este podría unirse alternativamente mediante técnicas de ingeniería genética. Los métodos para la producción de proteínas marcadas de forma detectable son bien conocidos en la técnica. Los marcadores detectables pueden seleccionarse entre varios de tales marcadores conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, radioisótopos, fluoróforos, marcadores paramagnéticos, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante) u otros residuos o compuestos que o bien emiten una señal detectable (por ejemplo, radiactividad, fluorescencia, color) o emiten una señal detectable después de la exposición del marcador a su sustrato. Varios pares de marcador detectable / sustrato (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante / diaminobencidina, avidina / estreptavidina, luciferasa / luciferina), métodos para marcar anticuerpos y métodos para usar anticuerpos marcados son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, eds. (*Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)).

60 Una “muestra biológica” abarca varios tipos de muestras obtenidas de un individuo y se pueden utilizar en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tal como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas del mismo y de la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que han sido manipulados de cualquier forma después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como polinucleótidos. La expresión “muestra biológica” abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejidos.

- Tal como se usa en la presente memoria, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se usa en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado que la tiene; (B) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.
- 5 “Medicamentos inmunosupresores” son cualquier molécula que interfiere con el sistema inmunitario y mitiga su respuesta a antígenos extraños o propios. La ciclofosfamida (CYC) y el micofenolato mofetilo (MMF) son dos de estos tipos de moléculas. Este término pretende abarcar cualquier fármaco o molécula útil como un agente terapéutico en la regulación negativa del sistema inmunitario.
- 10 Una “proteína de fusión” y un “polipéptido de fusión” se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones covalentemente unidas entre sí, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como la actividad in vitro o in vivo. La propiedad también puede ser una propiedad química o física simple, tal como la unión a una molécula diana, la catálisis de una reacción, etc. Las dos porciones pueden estar unidas directamente por un enlace peptídico sencillo o a través de un conector peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácidos. En general, las dos porciones y el enlazador estarán en marco de lectura entre sí.
- 15 Un “conjugado” se refiere a cualquier molécula híbrida, incluyendo proteínas de fusión, así como a moléculas que contienen tanto porciones de aminoácidos o proteínas como porciones no proteicas. Los conjugados se pueden sintetizar por varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase de solución, técnicas de síntesis química orgánica o una combinación de estas técnicas. La elección de la síntesis dependerá de la molécula particular que se genere. Por ejemplo, una molécula híbrida no totalmente “proteína” en la naturaleza se puede sintetizar mediante una combinación de técnicas recombinantes y técnicas en fase de solución.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “proteína de fusión de Fc” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las proteínas de fusión de Fc comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la del reconocimiento de antígenos y sitio de unión de un anticuerpo (esto es, “heteróloga”) y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La molécula proteína de fusión de Fc generalmente incluye una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la proteína de fusión de Fc puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Por ejemplo, las proteínas de fusión de Fc útiles de acuerdo con esta invención son polipéptidos que comprenden las porciones de unión a BLYS de un receptor de BLYS sin las secuencias transmembrana o citoplasmática de los receptores de BLYS. En una realización, el dominio extracelular de BAFF-R, TACI o BCMA se fusiona a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.
- 25 Los términos “individuo”, “sujeto” y “paciente” usados indistintamente en la presente memoria, se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, murinos, simios, seres humanos, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos y animales mamíferos de compañía.
- 30 El término “mamífero” se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, de zoológico, deportivos o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero en la presente memoria es un ser humano.
- 35 **Detección de HT (polipéptidos APRIL y BLYS)**
- 40 La presente invención proporciona la detección de polipéptidos HT a través de la medición separada de polipéptidos APRIL y BLYS. La expresión “polipéptido APRIL” abarca una secuencia de aminoácidos codificada por un marco de lectura abierto (ORF) de un polinucleótido APRIL conocido (como los que están a disposición pública con el Número de Acceso del GenBank AF046888), incluyendo el polipéptido nativo de longitud completa y fragmentos del mismo, en particular fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales, por ejemplo, una región o dominio que tiene actividad biológica, etc.; fragmentos antigénicos del mismo e incluyendo fusiones de los polipéptidos objeto con otras proteínas o partes de las mismas. Se han divulgado las secuencias de aminoácidos de polipéptidos APRIL. (Véase, por ejemplo, Hahne *et al.*, J. Exp. Med. 188:1185-1190, 1998). Los polipéptidos APRIL se pueden aislar de varias fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente o prepararse mediante métodos recombinantes y/o de síntesis. Un polimorfismo en un polipéptido APRIL se define generalmente con respecto a una secuencia de referencia.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

La expresión "polipéptido BLYS" abarca una secuencia de aminoácidos codificada por un marco de lectura abierto (ORF) de un polinucleótido BLYS conocido (tal como los disponibles públicamente a través de GenBank o su complemento: N.º de acceso NM 052945 (ARNm de BLYS humano) o sus variantes humanas con N.º de acceso 003808, 172087, 172088 o N.º de Acceso 033622 (ARNm de BLYS de ratón)), incluyendo el polipéptido nativo de longitud completa y fragmentos del mismo, en particular fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales, por ejemplo, una región o dominio que tiene actividad biológica, etc.; fragmentos antigénicos del mismo e incluyendo fusiones de los polipéptidos objeto con otras proteínas o partes de las mismas. Se han divulgado las secuencias de aminoácidos de polipéptidos BLYS. (Véase, por ejemplo Moore *et al.* Science 285:260-3, 1999). Los polipéptidos BLYS pueden ser aislados de varias fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes y/o de síntesis. Un polimorfismo en un polipéptido BLYS se define generalmente con respecto a una secuencia de referencia.

Como se usa en la presente memoria, "polipéptido APRIL polimórfico" se refiere a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido recombinante o no recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de i) un polipéptido APRIL polimórfico nativo, ii) un fragmento de un polipéptido APRIL polimórfico, iii) análogos de polipéptido de un polipéptido APRIL polimórfico, iv) variantes de un polipéptido APRIL polimórfico; v) un fragmento inmunológicamente activo de un polipéptido APRIL polimórfico; y vi) proteínas de fusión que comprenden un polipéptido APRIL polimórfico. Los polipéptidos APRIL polimórficos de la invención se pueden obtener a partir de una muestra biológica, o de cualquier fuente sea natural, sintético, semisintética o recombinante.

Como se usa en la presente memoria, "polipéptido BLYS polimórfico" se refiere a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido recombinante o no recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de i) un polipéptido BLYS polimórfico nativo, ii) un fragmento de un polipéptido BLYS polimórfico, iii) análogos de polipéptido de un polipéptido BLYS polimórfico, iv) variantes de un polipéptido BLYS polimórfico; v) un fragmento inmunológicamente activo de un polipéptido BLYS polimórfico; y vi) proteínas de fusión que comprenden un polipéptido BLYS polimórfico. Los polipéptidos BLYS polimórficos de la invención se pueden obtener a partir de una muestra biológica, o de cualquier fuente sea natural, sintético, semisintética o recombinante.

Las expresiones "polipéptido BLYS" o "polipéptido APRIL" abarcan un polipéptido que comprende de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos, al menos aproximadamente 75 aminoácidos, al menos aproximadamente 100 aminoácidos, al menos aproximadamente 200 aminoácidos, al menos aproximadamente 300 aminoácidos, al menos aproximadamente 400 aminoácidos o hasta la totalidad del polipéptido de un polipéptido APRIL o BLYS polimórfico. En algunas realizaciones, un polipéptido APRIL o BLYS polimórfico presenta actividad biológica, por ejemplo, el polipéptido provoca la proliferación de linfocitos B y la producción de inmunoglobulina en un ensayo *in vitro*. En la técnica se conocen otros ensayos de la actividad biológica de APRIL o BLYS y se pueden utilizar para determinar si un polipéptido APRIL o BLYS polimórfico presenta actividad biológica y, si se desea, para cuantificar la actividad biológica de APRIL o BLYS. Los ensayos biológicos de APRIL o BLYS se describen en diversas publicaciones, por ejemplo, Moore *et al.*, supra.

Los polipéptidos APRIL se pueden obtener por cualquier método conocido, o una combinación de tales métodos, incluyendo el aislamiento a partir de fuentes naturales; la producción por síntesis química y la producción mediante técnicas recombinantes estándar. Los polipéptidos APRIL se pueden aislar a partir de una fuente biológica, usando la cromatografía de afinidad, por ejemplo, usando anticuerpos específicos para un polipéptido APRIL se inmovilizan sobre un soporte sólido. Los polipéptidos pueden ser expresados en procariontes o eucariotes de acuerdo con formas convencionales, dependiendo de la finalidad de la expresión. Para la producción a gran escala de la proteína, se puede usar como las células del hospedador de expresión un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores de baculovirus o células de un organismo superior tal como vertebrados, particularmente mamíferos, por ejemplo, células COS 7, células CHO, células HEK293 y similares. En algunas situaciones, es deseable expresar el gen en células eucarióticas, donde la proteína se beneficiará del plegamiento nativo y de las modificaciones post-traduccionales. El polipéptido se puede aislar a partir del sobrenadante del cultivo celular o de lisados celulares usando métodos de cromatografía de afinidad o métodos de cromatografía de intercambio aniónico/tamaño de exclusión, tal como se describe anteriormente.

Con la disponibilidad de la proteína o fragmentos de la misma en grandes cantidades, mediante el empleo de un hospedador de expresión, la proteína se puede aislar y purificar de acuerdo con formas convencionales. Se puede preparar un lisado del hospedador de expresión y el lisado se puede purificar usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Las proteínas aisladas pueden ser utilizadas para producir anticuerpos, los cuales, a su vez, se usan para detectar la presencia de esa proteína usando sistemas de ensayo estándar, por ejemplo, ELISA o análisis FACS.

Preparación de polipéptidos APRIL y BLYS

Además de la pluralidad de usos descritos en mayor detalle en las secciones siguientes, las composiciones de ácido nucleico de APRIL se usan en la preparación de la totalidad o una porción de los polipéptidos APRIL, como se describe anteriormente. Los polinucleótidos (incluyendo ADNc o el gen de longitud completa) se usan para expresar un producto génico parcial o completo. Las construcciones que comprenden los polinucleótidos objeto se pueden generar sintéticamente. Alternativamente, el ensamblaje en una sola etapa de un gen y de un plásmido entero a partir de un gran número de oligodesoxirribonucleótidos se describe por, por ejemplo, en Stemmer *et al*, Gene (Ámsterdam) (1995) 164(1):49-53. En este método, se describe el ensamblaje por PCR (la síntesis de secuencias de ADN largas de un gran número de oligodesoxirribonucleótidos (oligos)). El método se deriva de la permutación de ADN (Stemmer, Nature (1994) 370:389-391) y no se basa en la ADN ligasa, sino que se basa en la ADN polimerasa para construir fragmentos de ADN cada vez más largos durante el proceso de ensamblaje. Las construcciones de polinucleótidos apropiadas se purifican usando técnicas de ADN recombinante estándar como se describe en, por ejemplo, Sambrook *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y según la normativa vigente se describen en las Directrices para la Investigación del ADN Recombinante de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) del Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos.

En particular, puede ser necesario proporcionar medios de ingeniería de trimerización de la proteína de APRIL o la proteína BLYS con el fin de poder producir cantidades suficientes de proteína activa para producir anticuerpos eficaces. Ejemplos de polipéptidos para trimerización tales como la secuencia ZymoZipper se divulgan en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º de Serie 11/530.672 y las referencias discutidas en la misma. Estos tipos de polipéptidos para trimerización también son útiles para la producción de proteína patrón de HT ABRIL/BLYS para su uso en el ensayo (véase el Ejemplo 1).

Las moléculas de polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos proporcionada en la presente memoria se propagan mediante la introducción de la molécula en un vector. Se usan vectores virales y no virales, incluyendo plásmidos. La elección del plásmido dependerá del tipo de célula en la que se desea la propagación y del propósito de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y fabricar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para transferencia y expresión en células en un animal entero o una persona. La elección del vector apropiado está dentro de la experiencia de la técnica. Muchos de tales vectores están disponibles comercialmente. El polinucleótido de longitud parcial o completa se inserta en un vector generalmente mediante la unión con la ADN ligasa a un sitio de una enzima de restricción escindido en el vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada puede insertarse mediante recombinación homóloga *in vivo*. Generalmente esto se lleva a cabo uniendo regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada. Las regiones de homología se añaden, por ejemplo, por ligación de oligonucleótidos, o mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprenden tanto la región de homología como una porción de la secuencia de nucleótidos deseada.

Para la expresión, se pueden emplear un casete o sistema de expresión. El producto génico codificado por un polinucleótido de la invención se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, incluyendo, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levadura, de insecto, de anfibios y de mamíferos. Vectores adecuados y células hospedadoras se describen en la Patente US-5.654.173. En el vector de expresión, un polinucleótido que codifica un polipéptido APRIL está ligado a una secuencia reguladora según sea apropiado para obtener las propiedades de expresión deseadas. Estos pueden incluir promotores (unidos o bien en el extremo 5' de la cadena sentido o en el extremo 3' de la cadena antisentido), potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores. Los promotores pueden ser regulados o constitutivos. En algunas situaciones puede ser deseable usar promotores condicionalmente activos, tales como promotores específicos de tejido o específicos de la etapa de desarrollo. Estos están vinculados a la secuencia de nucleótidos deseada usando las técnicas descritas anteriormente para ligamiento a vectores. Se puede usar cualquier técnica conocida en la técnica. En otras palabras, el vector de expresión proporcionará una región de iniciación de la transcripción y de la traducción, que puede ser inducible o constitutiva, donde la región de codificación está operativamente enlazada bajo el control transcripcional de la región de iniciación de la transcripción y una región de terminación de la transcripción y de la traducción. Estas regiones de control pueden ser nativas para el gen de APRIL o se pueden derivar de fuentes exógenas.

Los vectores de expresión generalmente tienen sitios de restricción convenientes situados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas heterólogas. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión. Los vectores de expresión se pueden utilizar para la producción de proteínas de fusión, donde el péptido de fusión exógeno proporciona una funcionalidad adicional, es decir, aumento de la síntesis de proteínas, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, un marcador de enzima, por ejemplo, β -galactosidasa, etc.

Los casetes de expresión se pueden preparar de modo que comprendan una región de iniciación de la transcripción, el gen o fragmento de la misma y una región de terminación de la transcripción. De particular interés es el uso de secuencias que permiten la expresión de epítopos o dominios funcionales, habitualmente al menos

aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, más habitualmente al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, a aproximadamente 25 aminoácidos y hasta completar el marco de lectura abierto del gen. Después de la introducción del ADN, las células que contienen la construcción se pueden seleccionar mediante un marcador seleccionable, se lleva a cabo la expansión de las células expandidas y a continuación se utilizan para la expresión.

Los polipéptidos APRIL pueden expresarse en procariotas o eucariotas de acuerdo con formas convencionales, dependiendo de la finalidad de la expresión. Para la producción a gran escala de la proteína, se puede usar las células del hospedador de expresión un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores de baculovirus o células de un organismo superior, tal como vertebrados, particularmente mamíferos, por ejemplo, células COS 7, HEK 293, CHO, oocitos de *Xenopus*, etc. En algunas situaciones, es deseable expresar una molécula de ácido nucleico APRIL polimórfico en células eucarióticas, donde la proteína APRIL polimórfica se beneficiará del plegamiento nativo y de las modificaciones post-traduccionales. Los péptidos pequeños también pueden sintetizarse en el laboratorio. Los polipéptidos que son subconjuntos de la secuencia completa APRIL pueden usarse para identificar e investigar partes de la proteína importantes para la función.

Sistemas de expresión específicos de interés incluyen bacterias, levaduras, células de insectos y sistemas de expresión derivados de células de mamíferos. A continuación se proporcionan sistemas representativos de cada una de estas categorías:

Bacterias. Los sistemas de expresión en bacterias incluyen aquellos descritos en Chang *et al.*, *Nature* (1978) 275:615; Goeddel *et al.*, *Nature* (1979) 281:544; Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1980) 8:4057; EP 0 036,776; patente US-4.551.433; DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1983) 80:21-25 y Siebenlist *et al.*, *Cell* (1980) 20:269.

Levaduras. Los sistemas de expresión en levaduras incluyen aquellos descritos en Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1978) 75:1929; Ito *et al.*, *J. Bacteriol.* (1983) 153:163; Kurtz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:142; Kunze *et al.*, *J. Basic Microbiol.* (1985) 25:141; Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* (1986) 132:3459; Roggenkamp *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202:302; Das *et al.*, *J. Bacteriol.* (1984) 158:1165; De Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.* (1983) 154:737; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology* (1990) 8:135; Kunze *et al.*, *J. Basic Microbiol.* (1985) 25:141; Cregg *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5:3376; patentes US-4.837.148 y US-4.929.555; Beach and Nurse, *Nature* (1981) 300:706; Davidow *et al.*, *Curr. Genet.* (1985) 10:380; Gaillardin *et al.*, *Curr. Genet.* (1985) 10:49; Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112:284-289; Tilburn *et al.*, *Gene* (1983) 26:205-221; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:1470-1474; Kelly and Hynes, *EMBO J.* (1985) 4:475479; EP 0 244,234; and WO 91/00357.

Células de insecto. La expresión de genes heterólogos en insectos se realiza como se describe en la patente US-4.745.051; Friesen *et al.*, "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: *The Molecular Biology Of Baculoviruses* (1986) (W. Doerfler, ed.); EP 0 127,839; EP 0 155,476 y Vlak *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1988) 69:765-776; Miller *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.* (1988) 42:177; Carbonell *et al.*, *Gene* (1988) 73:409; Maeda *et al.*, *Nature* (1985) 315:592-594; Lebacqz-Verheyden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8:3129; Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1985) 82:8844; Miyajima *et al.*, *Gene* (1987) 58:273 y Martin *et al.*, *DNA* (1988) 7:99. En Luckow *et al.*, *Bio/Technology* (1988) 6:47-55, Miller *et al.*, *Generic Engineering* (1986) 8:277-279 y Maeda *et al.*, *Nature* (1985) 315:592-594 se describen numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células hospedadoras de insectos permisivas.

Células de mamíferos. La expresión en mamíferos se realiza como se describe en Dijkema *et al.*, *EMBO J.* (1985) 4:761, Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:6777, Boshart *et al.*, *Cell* (1985) 41:521 y patente US-4.399.216. Otras características de la expresión en mamíferos son facilitadas como se describe en Ham y Wallace, *Meth. Enz.* (1979) 58:44, Barnes y Sato, *Anal. Biochem.* (1980) 102: 255, patentes US-4.767.704, US-4.657.866, US-4.927.762, US-4.560.655, WO 90/103430, WO 87/00195 y patente US RE N.º 30.985.

Cuando se usa cualquiera de las células hospedadoras anteriores u otras células hospedadoras u organismos apropiados para replicar y/o expresar los polinucleótidos o ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, el ácido nucleico replicado resultante, ARN, proteína expresada o polipéptido, se describe en la presente memoria como un producto de la célula u organismo hospedadores. El producto se recupera por cualquier medio apropiado conocido en la técnica.

Una vez identificado el gen correspondiente a un polinucleótido seleccionado, su expresión puede ser regulada en la célula para la que el gen es nativo. Por ejemplo, un gen endógeno de una célula puede ser regulado por una secuencia reguladora exógena insertada en el genoma de la célula en la ubicación suficiente para al menos mejorar la expresión del gen en la célula. La secuencia reguladora puede diseñarse para integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga, como se divulga en las patentes US-5.641.670 y 5.733.761 o puede diseñarse para integrarse en el genoma mediante recombinación no homóloga, como se describe en el documento WO 99/15650. Como tal, también se describe en la presente memoria la producción de proteínas ABRIL sin manipulación del propio ácido nucleico que codifica, sino en su lugar a través de la integración de una secuencia reguladora en el genoma de célula que ya incluye un gen que codifica la proteína deseada, como se describe en los documentos de patente anteriormente incorporados.

Preparación de anticuerpos específicos de los polipéptidos APRIL y BLYS

Los métodos in vitro de la invención usan anticuerpos, en particular anticuerpos aislados que son específicos de los polipéptidos APRIL y BLYS. Los anticuerpos son útiles en varios ensayos de diagnóstico, como se describe en más detalle a continuación. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para detectar y/o medir las concentraciones de HT en una muestra biológica.

Los polipéptidos APRIL y BLYS aislados son útiles para la producción de anticuerpos, donde los fragmentos cortos proporcionan anticuerpos específicos del polipéptido particular y fragmentos mayores o la proteína entera permiten la producción de anticuerpos sobre la superficie del polipéptido. En consecuencia, los métodos de la presente invención usan anticuerpos aislados que se unen específicamente a un polipéptido APRIL, o un fragmento antigénico del mismo. Pueden obtenerse anticuerpos contra el tipo natural o contra formas variantes. Pueden obtenerse anticuerpos contra péptidos aislados correspondientes a estos dominios o contra la proteína nativa. Pueden obtenerse anticuerpos contra polipéptidos y/o fragmentos peptídicos de APRIL de cualquier especie de mamífero. Como un ejemplo no limitativo, se puede usar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la especificidad de un anticuerpo monoclonal dado para un polipéptido APRIL o BLYS.

Los polipéptidos APRIL y BLYS son útiles para la producción de anticuerpos, donde los fragmentos cortos proporcionan anticuerpos específicos para el polipéptido particular y fragmentos mayores o la proteína entera permiten la producción de anticuerpos sobre la superficie del polipéptido. Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica al antígeno, incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, Fv, scFv y fragmentos Fd, proteínas de fusión que comprenden dichos fragmentos de anticuerpos, anticuerpos marcados de forma detectable y anticuerpos quiméricos. "Especificidad de anticuerpos", en el contexto de las interacciones anticuerpo-antígeno, es un término bien entendido en la técnica e indica que un anticuerpo dado se une a un antígeno dado, en el que la unión puede ser inhibida por ese antígeno o un epítipo del mismo, que es reconocido por el anticuerpo y no se une sustancialmente a los antígenos no relacionados. Los métodos para determinar la unión específica de anticuerpos son bien conocidos para los expertos en la técnica y se pueden utilizar para determinar la especificidad de anticuerpos para un polipéptido APRIL o BLYS.

Los anticuerpos se preparan de acuerdo con métodos convencionales, en los que se usan el polipéptido o proteína expresados como inmunógeno, tal cual o conjugados con vehículos inmunogénicos conocidos, por ejemplo, KLH, pre-S HBsAg, otras proteínas virales o eucariotas, o similares. Se pueden emplear varios adyuvantes, con una serie de inyecciones, según sea apropiado. Para los anticuerpos monoclonales, después de una o más inyecciones de refuerzo, se aísla el bazo, los linfocitos se immortalizan por fusión celular y a continuación se seleccionan para determinar la unión de anticuerpos de alta afinidad. Las células inmortalizadas, es decir, hibridomas, que producen los anticuerpos deseados pueden ser a continuación expandidas. Para una descripción más detallada, véase Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. Si se desea, el ARNm que codifica para las cadenas pesadas y ligeras se puede aislar y mutagenizar mediante clonación en *E. coli* y mezclar las cadenas pesadas y ligeras para mejorar aún más la afinidad del anticuerpo. Las alternativas a la inmunización in vivo como un método de producción de anticuerpos incluyen unión a bibliotecas de expresión en fagos, habitualmente junto con la maduración por afinidad in vitro.

Los anticuerpos se pueden fijar, directa o indirectamente (por ejemplo, a través de una molécula de enlace) a un soporte sólido para su uso en un ensayo de diagnóstico para determinar y/o medir la presencia de HT en una muestra biológica. La fijación es generalmente covalente, aunque no tiene por qué ser así. Los soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, perlas (por ejemplo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas y similares); superficies de plástico (por ejemplo, placas multipocillo de poliestireno o policarbonato usadas normalmente en un ELISA o radioinmunoensayo (RIA), y similares); láminas, por ejemplo, de nylon, nitrocelulosa, y similares y virutas, por ejemplo, virutas de SiO₂ tales como las utilizadas en micromatrices. En consecuencia, la invención proporciona además dispositivos de ensayo que comprenden anticuerpos fijados a un soporte sólido.

Para crear un dispositivo de ensayo se puede utilizar un único anticuerpo o una batería de anticuerpos diferentes. Dicho dispositivo de ensayo puede prepararse usando la tecnología convencional conocida por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede purificarse y aislarse usando técnicas conocidas y unirse a una superficie de soporte usando procedimientos conocidos. La superficie que tiene unido en anticuerpo sobre la misma resultante se puede utilizar para ensayar una muestra de ensayo, por ejemplo, una muestra biológica, in vitro para determinar si la muestra contiene uno o más tipos de moléculas HT. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen únicamente a un epítipo específico de HT se pueden fijar a la superficie de un material. Como alternativa, se puede usar una pluralidad de anticuerpos específicos, que pueden estar dispuestos en una matriz, en donde los anticuerpos específicos de dos o más epítopos de HT diferentes están fijados al soporte sólido. Una muestra de ensayo se pone en contacto con los anticuerpos unidos a la superficie del material. La unión específica puede detectarse usando cualquier método conocido. Si la unión específica no se detecta, se puede deducir que la muestra no contiene el epítipo HT específico. Como un ejemplo no limitante de cómo se puede detectar la unión específica, una vez que la muestra de ensayo ha sido puesta en contacto con los anticuerpos unidos al soporte sólido, se puede añadir un segundo anticuerpo, marcado de forma detectable, el cual reconoce un epítipo HT distinto al epítipo reconocido por

el anticuerpo unido al soporte sólido.

Otros varios reactivos se pueden incluir en los ensayos para detectar los polipéptidos HT descritos en la presente memoria. Estos incluyen reactivos tales como sales, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc. que se usan para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. Se pueden utilizar reactivos que mejoran la eficiencia del ensayo, tales como inhibidores de la proteasa, agentes antimicrobianos, etc. Los componentes se añaden en cualquier orden que proporcione la unión requerida. Las incubaciones se realizan a cualquier temperatura adecuada, generalmente entre 4 °C y 40 °C. Los periodos de incubación se seleccionan para una actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar la selección rápida de alto rendimiento. Generalmente entre 0,1 y 1 horas serán suficientes.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos son aquellos que pueden unirse a dos epítopos diferentes del marcador de la superficie de los linfocitos B. Otros de estos anticuerpos pueden unirse a un primer marcador de linfocitos B y se unen, además, a un segundo marcador de la superficie de linfocitos B. Como alternativa, un brazo de unión a un marcador de linfocitos B puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptor de linfocitos T (por ej. CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcyR), tales como FcyRI (CD64), FcyRII (CD32) y FcyRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celular en el linfocito B. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en el linfocito B. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a un marcador de linfocitos B y un brazo que se une al agente citotóxico (por ej., saporina, anti-interferón, alcaloide de la vinca, cadena A de la ricina, metotrexato o hapteno marcado con isótopo radioactivo).

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Milstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)).

Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO93/08829 y en Trauneker *et al*, EMBO J., 10:3655-3.659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de los anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH₂, y CH₃. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH₁) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son co-transfectados en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que se usan proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido en la construcción proporcionando los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen una importancia especial.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986). Según otro enfoque descrito en la Patente US-5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH₃ de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ej., tirosina o triptófano). En la interfase de la segunda molécula de anticuerpo se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena(s) lateral grande mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (patente US-4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089).

5 Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la Patente US-4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

10 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando unión química. Brennan *et al*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F (ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito sódico para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

20 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, los cuales pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F (ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

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

35 Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo.

40 La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6.444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv). Véase Gruber *et al*, J. Immunology, 152:5368 (1994). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol.147:60 (1991).

Ensayos de diagnóstico

50 La memoria descriptiva describe métodos para detectar la presencia de y/o una concentración de ARNm de HT en una muestra biológica y métodos para detectar la presencia de y/o una concentración de polipéptido HT en una muestra biológica.

55 La invención implica la detección en serie de cada subunidad individual en la muestra de tal manera que puedan detectarse sólo las moléculas HT. Esto se hace usando un procedimiento que es una adaptación de cómo funciona un ELISA estándar. En particular, se inmoviliza un anticuerpo contra APRIL o BLYS (por ejemplo, se fija a una perla) y la muestra se pone en contacto con este anticuerpo. Aquellas moléculas que comprenden la subunidad para la que es específico el anticuerpo se unirán, mientras que los homotrímeros que no incluyen esa subunidad serán lavados. Las moléculas unidas a continuación se ponen en contacto con un anticuerpo detectable (marcado) contra la segunda subunidad (por ejemplo, biotina) y se detectarán las moléculas que se capturaron primero que también incluyen la segunda subunidad (es decir, aquellas moléculas que son HT). Más específicamente, si el primer anticuerpo es contra APRIL, todas las moléculas BLYS homotriméricas serán lavadas en la primera etapa. Cuando estas moléculas se ponen en contacto con el segundo anticuerpo que es específico de BLYS, todas las moléculas APRIL homotriméricas no se unirán y serán lavadas. Por lo tanto, la señal restante será representativa de las moléculas HT (las que comprenden ambos, BLYS y ABRIL) en la muestra. La molécula HT estándar conocida 2 de APRIL/una de BLYS se utiliza para construir una curva patrón de concentración y la señal experimental obtenida se compara con esta curva patrón para producir una estimación de la concentración de HT en la muestra biológica.

También se describe en la presente memoria un método para detectar una concentración ARNm de HT en una muestra biológica derivada de un individuo, que comprende analizar en una muestra de polinucleótidos de un individuo la concentración de ARNm que codifica para el polipéptido HT. La concentración de ARNm de HT puede estar asociada a una enfermedad autoinmunitaria.

5 En otras realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia de y/o la concentración de un polipéptido HT en una muestra biológica.

10 Existen varios métodos para la determinación del nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico de HT, por ejemplo, un ARNm de HT o polipéptido de HT en una muestra particular. El diagnóstico puede ser realizado por diversos métodos para determinar la ausencia o presencia o cantidades alteradas normales o anormales de ARNm de HT en una muestra de un paciente. Por ejemplo, la detección puede utilizar tinción de células o cortes histológicos con anticuerpos marcados, realizada de acuerdo con métodos convencionales. Las células se permeabilizaron para teñir moléculas citoplasmáticas. Los anticuerpos de interés se añaden a la muestra celular y se incuban durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión al epítipo, normalmente al menos 15 aproximadamente 10 minutos. El anticuerpo puede marcarse con radioisótopos, enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes u otros marcadores para la detección directa. En otra alternativa, se usa un anticuerpo o reactivo en una segunda etapa para amplificar la señal. Tales reactivos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo primario puede conjugarse con biotina, avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante 20 añadido como reactivo de la segunda etapa. En otra alternativa, el anticuerpo secundario se conjuga con un compuesto fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, etc. La detección final usa un sustrato que experimenta un cambio de color en presencia de la peroxidasa. La ausencia o presencia de la unión del anticuerpo se puede determinar por varios métodos, incluyendo la citometría de flujo de células disociadas, microscopía, radiografía, recuento de centelleo, etc. La presencia y/o la concentración de un polipéptido HT también se puede 25 detectar y/o cuantificar de cualquier manera conocida para un experto ordinario.

Además, una prueba puede incluir mediciones de la expresión del ARNm del HT. Se pueden realizar estudios bioquímicos para determinar si un polimorfismo de una secuencia en una región de codificación de HT o en regiones de control está asociado a la enfermedad. Los polimorfismos asociados a la enfermedad pueden incluir la delección o 30 truncamiento del gen, mutaciones que alteran el nivel de expresión, que afectan a la actividad de la proteína, etc.

Los cambios en la secuencia del promotor o del potenciador que pueden afectar a los niveles de expresión del HT se pueden comparar con los niveles de expresión del alelo normal mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Los métodos para determinar la fuerza del promotor o del potenciador incluyen la cuantificación de la 35 proteína natural expresada; la inserción del elemento de control variante en un vector con un gen indicador, tal como β -galactosidasa, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, etc., que proporciona la cuantificación conveniente; y similares.

Los métodos de diagnóstico de la presente invención (como se define en las reivindicaciones) en los que es de interés la concentración de HT, implican la comparación de la abundancia del ácido nucleico de HT o proteína de una muestra de interés con la de un valor de control para determinar cualquier diferencia relativa, donde la diferencia se puede medir cualitativamente y/o cuantitativamente, diferencias que entonces se relacionan con la presencia o ausencia de concentraciones anormales de HT. Una amplia variedad de diferentes métodos para determinar la abundancia de ácido nucleico en una muestra son conocidos por los expertos en la técnica, donde los métodos 40 particulares de interés incluyen los descritos en: Pietu *et al.*, Genome Res. (June 1996) 6:492-503; Zhao *et al.*, Gene (Apr. 24, 1995) 156:207-213; Soares, Curr. Opin. Biotechnol. (October 1997) 8:542-546; Raval, J. Pharmacol Toxicol Methods (November 1994) 32: 125-127; Chalifour *et al.*, Anal. Biochem (Feb. 1, 1994) 216:299-304; Stolz & Tuan, Mol. Biotechnol. (December 1996) 6:225-230; Hong *et al.*, Bioscience Reports (1982) 2:907 y McGraw, Anal. Biochem. (1984) 143: 298. También son de interés los métodos divulgados en el documento WO 97/27317. 45

50 Por un gen cuyo nivel de expresión está "correlacionado con" o "asociado a" un estado fisiológico particular, se entiende un gen cuya expresión muestra una correlación estadísticamente significativa con el estado fisiológico. La fuerza de la correlación entre el nivel de expresión de un gen expresado diferencialmente y la presencia o ausencia de un estado fisiológico particular puede ser determinada por una prueba de significación estadística. Los métodos para determinar la fuerza de una correlación entre el nivel de expresión de un gen diferencialmente expresado y un estado fisiológico particular, mediante la asignación de una puntuación estadística a la correlación se revisan en Holloway *et al.* (2002) Nature Genetics Suppl. 32:481-89, Churchill (2002) Nature Genetics Suppl. 32:490-95, Quackenbush (2002) Nature Genetics Suppl. 32: 496-501; Slonim (2002) Nature Genetics Suppl. 32:502-08 y Chuaqui *et al.* (2002) Nature Genetics Suppl. 32:509-514. Las puntuaciones estadísticas se pueden utilizar para 60 seleccionar los genes cuyos niveles de expresión tienen la mayor correlación con un estado fisiológico particular con el fin de aumentar la precisión diagnóstica o pronóstica de los métodos de la invención.

Las pruebas adicionales que se han asociado a la gravedad de la enfermedad autoinmunitaria o la progresión se pueden combinar con la prueba HT se ha descrita anteriormente para hacer un diagnóstico o pronóstico de resultados completo. 65

Por ejemplo, el Colegio Americano de Reumatología ha elaborado 11 criterios para el diagnóstico del LES, que abarcan todo el espectro clínico del LES en los aspectos de la piel, sistémicos y de pruebas de laboratorio. Estos criterios incluyen exantema malar, erupción discoide, sensibilidad a la luz del sol, úlceras orales, artritis, serositis, inflamación del riñón y del sistema nervioso central, alteraciones de la sangre y la presencia de anticuerpos antinucleares. Un paciente debe cumplir con cuatro de estos criterios con el fin de ser clasificado como un paciente con LES. (Tan *et al.* (1982) *Arthritis Rheumatol.* 25:1271-77). El LES se suele confirmar mediante pruebas, incluyendo, pero sin limitarse a, análisis de sangre para detectar anticuerpos anti-nucleares; análisis de sangre y orina para evaluar la función renal; pruebas del complemento para detectar la presencia de bajas concentraciones de complemento que a menudo están asociadas a LES; la velocidad de sedimentación globular (VSG) o la proteína C-reactiva (PCR) para medir los niveles de inflamación; radiografías para evaluar el daño pulmonar y electrocardiogramas para evaluar el daño cardíaco.

Control de los efectos del tratamiento farmacológico

El control de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos, compuestos) sobre las concentraciones de proteína HT (por ejemplo, la modulación de la activación de la transcripción) se puede aplicar no sólo en el cribado básico de fármacos, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente determinada mediante un ensayo de cribado como se describe en la presente memoria para reducir de las concentraciones de proteína HT, puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que muestran una disminución en la expresión de genes HT o en las concentraciones de proteína. En tales ensayos clínicos, puede usarse la expresión o actividad de un gen HT, y preferiblemente, otros genes que han sido implicados en, por ejemplo, un trastorno asociado a concentraciones de proteína HT, como una "lectura" o marcadores del fenotipo de una célula en particular, en el presente caso, los linfocitos B.

En algunas realizaciones, la presente memoria describe un método para controlar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra pre-administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de una proteína o ARNm HT, en la muestra pre-administración; (iii) obtener una o más muestras post-administración del sujeto, (iv) detectar el nivel de expresión o actividad de la proteína o ARNm HT en las muestras post-administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína o ARNm HT en la muestra pre-administración con la proteína o ARNm HT en la muestra o muestras post-administración y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. De acuerdo con tal realización, la expresión o actividad del HT se puede usar como un indicador de la eficacia de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

El nivel de expresión basal de HT en el tejido diferente puede ser determinado mediante el análisis de muestras de tejido de individuos tipificados para la presencia o ausencia de un polimorfismo específico. Se puede usar cualquier método conveniente, por ejemplo, ELISA, RIA, etc. para la cuantificación de las proteínas, transferencia Northern u otro análisis de hibridación, RT-PCR cuantitativa, etc. para la cuantificación del ARNm. La expresión específica en tejido se correlaciona con el genotipo.

La alteración de la expresión del HT en respuesta a un modificador se determina mediante la administración o la combinación del modificador candidato con un sistema de expresión, por ejemplo, animal, célula, ensayo de transcripción *in vitro*, etc. Se determina el efecto del modificador sobre la transcripción del HT y/o las concentraciones de ARNm en el estado estacionario. Al igual que con los niveles de expresión basales, las interacciones específicas en el tejido son de interés. Las correlaciones se realizan entre la capacidad que tiene un modificador de la expresión para afectar las concentraciones de HT y la presencia de los polimorfismos proporcionados. Se puede examinar un panel de diferentes modificadores, tipos de células, etc., con el fin de determinar el efecto en una serie de diferentes afecciones.

Métodos de tratamiento

La presente invención proporciona un método de tratamiento de un individuo clínicamente diagnosticado con una afección asociada a concentraciones elevadas de HT en suero. Los métodos generalmente comprenden analizar una muestra biológica para medir las concentraciones de HT y comparar estas concentraciones con las presentes en los controles sanos. A continuación, se selecciona el plan de tratamiento que sea más eficaz para los individuos diagnosticados clínicamente de tener una afección asociada a concentraciones elevadas de HT, tales como una enfermedad autoinmunitaria y, a continuación, el paciente es tratado en consecuencia. Por lo tanto, la invención proporciona además un método para predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico para una afección asociada a concentraciones elevadas de HT, que comprende determinar la expresión en el paciente de un gen de HT, en el que la presencia de concentraciones elevadas de HT está asociada a una enfermedad autoinmunitaria, tal como LES, y es predictiva de la probabilidad que tiene el paciente de responder a un tratamiento farmacológico para la afección.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona métodos para adaptar el tratamiento terapéutico de un individuo con la expresión de HT de acuerdo con la respuesta al fármaco de ese individuo. La farmacogenómica

permite a un clínico o médico dirigir los tratamientos profilácticos o terapéuticos a los pacientes que más se beneficiarán del tratamiento y evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con el fármaco.

5 Enfermedades autoinmunitarias

La siguiente es una lista no limitativa de las posibles enfermedades autoinmunitarias cuyo tratamiento podría favorecerse por el uso del ensayo de medición de HT actualmente descrito. Las enfermedades autoinmunitarias reguladas por linfocitos B incluyen artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica), psoriasis, dermatitis incluyendo dermatitis atópica; urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma sistémico y esclerosis, respuestas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), meningitis, rinitis alérgica, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eczema, asma, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de los leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus (incluyendo nefritis, no renal, discoide, alopecia), diabetes juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, respuestas inmunitarias asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluyendo granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo ANCA), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, aplasia pura de células rojas (APCR), deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión orgánica múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad anti-membrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplantes de órganos sólidos (incluyendo el tratamiento previo para títulos altos del panel de anticuerpos reactivos, depósito de IgA en los tejidos, etc.), enfermedad de injerto contra huésped (EICH), penfigoide ampolloso, pénfigo (todos, incluidos vulgar, foliáceo), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, arteritis de células gigantes, nefritis por inmucomplejos. Nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunitarias, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes autoinmunitarios poliglandulares (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes tipo I también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfocítica (VIH), bronquiolitis obliterante (no de trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, celiacía (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, ELA y arteriopatía coronarias.

Antagonistas de BLYS y/o APRIL

Si se observan concentraciones elevadas de HT en un paciente que sufre una enfermedad autoinmunitaria, esto sugiere la probabilidad de que el paciente responderá favorablemente a la inhibición de BLYS y/o APRIL. Así, la presente memoria describe antagonistas de BLYS y/o APRIL que se usan para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en las que el paciente tiene concentraciones elevadas de HT. Los siguientes son ejemplos representativos de antagonistas de BLYS y/o APRIL que podrían utilizarse para el tratamiento de tales pacientes. A los efectos de funcionamiento como un antagonista de BLYS y/o APRIL, el dominio extracelular de cualquiera de los receptores de la familia de TNFR es un polipéptido esencialmente libre de los dominios transmembrana o citoplásmicos que generalmente retienen la capacidad de unir BLYS. Específicamente, el dominio extracelular de TACI puede comprender los aminoácidos 1 a 154 de la secuencia del polipéptido TACI (SEQ ID NO: 2). Además, el DEC pueden ser fragmentos o variantes de esta secuencia, tales como formas de DEC de TACI como se describe en von Bulow *et al.*, supra y en los documentos WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979 y WO 01/81417. En particular, estas formas de DEC pueden comprender los aminoácidos 1-106 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1-142 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 30-154 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 30-106 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 30-110 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 30-119 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1-166 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1-165 de la SEC ID NO: 2, aminoácidos 1-114 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1-120 de la SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 1-126 de la SEQ ID NO: 2. Además, el DEC de TACI puede comprender aquellas moléculas que tienen sólo un dominio rico en cisteína.

Formas de DEC de BAFF-R incluyen aquellas que comprenden los aminoácidos 1-71 de la secuencia de polipéptido BAFF-R (SEQ ID NO: 4). Además, el DEC pueden ser fragmentos o variantes de esta secuencia, tales como formas de DEC de BAFF-R como se describe en los documentos WO 02/24909, WO 03/14294 y WO 02/38766. En particular, estas formas de DEC pueden comprender los aminoácidos 1-77 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 7-77

de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 1-69 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 7-69 de SEQ ID NO: 4, los aminoácidos 2-62 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 2-71 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 1-61 de la SEQ ID NO: 4 y los aminoácidos 2-63 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 1-45 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 1-39 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 7-39 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 1-17 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 39-64 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 19-35 de la SEQ ID NO: 4 y aminoácidos 17-42 de la SEQ ID NO: 4. Además, el DEC de BAFF-R puede comprender aquellas moléculas que tienen un dominio rico en cisteína.

Formas de DEC de BCMA incluyen aquellas que comprenden los aminoácidos 1-48 de la secuencia de polipéptido BCMA (SEQ ID NO: 6). Además, el DEC pueden ser fragmentos o variantes de esta secuencia, tales como formas de DEC de BCMA como se describe en los documentos WO 00/40716 y WO 05/075511. En particular, estas formas de DEC pueden comprender los aminoácidos 1-150 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 1-48 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 1-41 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 8-41 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 8-37 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 8-88 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 41-88 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 1-54 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 4-55 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 4-51 de la SEQ ID NO: 6 y aminoácidos 21-53 de SEQ ID NO: 6. Además, el DEC de BCMA puede comprender aquellas moléculas que tienen solamente un dominio parcial rico en cisteína.

En una realización adicional, la región de unión de BLYS de un receptor de BLYS (por ej., un dominio extracelular o fragmento del mismo de BAFF-R, BCMA o TACI) se pueden fusionar con una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina para facilitar su solubilidad in vivo. De acuerdo con una realización, los antagonistas de BLYS y/o APRIL se unen a un polipéptido BLYS con una afinidad de unión de 100 nM o menos. De acuerdo con otra realización, los antagonistas de BLYS y/o APRIL se unen a un polipéptido BLYS con una afinidad de unión de 10 nM o menos. De acuerdo con otra realización más, los antagonistas de BLYS y/o APRIL se unen a un polipéptido BLYS con una afinidad de unión de 1 nM o menos.

En otro ejemplo, los antagonistas de BLYS y/o APRIL incluyen polipéptidos de unión a BLYS que no son secuencias nativas o variantes de las mismas. Algunos ejemplos de tales polipéptidos son aquellos que tienen la secuencia de Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III como se describe en el documento WO 05/000351. En particular, algunos polipéptidos de unión incluyen ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO: 13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO: 14), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEQ ID NO: 15), ECFDLLVRSWVPCMLLR (SEQ ID NO: 16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO: 17), o las secuencia mostradas en la FIG. 32 del documento WO 05/000351.

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

En algunas realizaciones, un antagonista de BLYS y/o APRIL incluye anticuerpos contra BLYS. Cuando se hace referencia al término "anticuerpo", se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos con especificidad de múltiples epítopos, anticuerpos de cadena única y fragmentos de anticuerpos. Según algunas realizaciones, un polipéptido de esta invención se fusiona en un marco de anticuerpo, por ejemplo, en la región variable o en una RDC tal que el anticuerpo puede unirse e inhibir la unión de BLYS a TACI, BAFF-R, o BCMA o inhibir la señalización de BLYS. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido pueden ser quiméricos, humanizados, o humanos. Los anticuerpos que comprenden un polipéptido pueden ser un fragmento de anticuerpo.

Como alternativa, un anticuerpo puede ser producido mediante la inmunización de un animal con un polipéptido. Por lo tanto, se contempla un anticuerpo dirigido contra un polipéptido descrito.

En particular, se contemplan los anticuerpos específicos de BLYS que se unen dentro de una región de BLYS humano (SEQ ID NO: 8) que comprende los residuos 162-275 y/o un aminoácido o aminoácidos vecinos seleccionados del grupo que consiste en 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 y 265 de BLYS humano. La unión de los anticuerpos es tal que el anticuerpo impide estéricamente la unión de BLYS a uno o más de sus receptores. Tales anticuerpos se describen en el documento WO 02/02641 y WO 03/055979. Un anticuerpo particularmente preferido es el descrito como LymphoStat-B (Baker *et al.* (2003) *Arthritis Rheum*, 48, 3253-3265).

Otros fármacos inmunosupresores

La memoria descriptiva describe el uso de otros fármacos inmunosupresores solos o en combinación con un inhibidor de BLYS y/o APRIL. Estos otros fármacos incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunosupresores tales como inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A o FK506), esteroides (por ejemplo, metil prednisona o prednisona) o agentes inmunosupresores que detienen el crecimiento de las células inmunitarias (por ejemplo, rapamicina), inhibidores de la vía anti-CD40 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-ligando de CD40 e inhibidores de moléculas pequeñas de la vía CD40), inhibidores de la ruta de recuperación de trasplante (por ejemplo, mofetil micofenolato (MMF)), antagonistas de los receptores de IL-2 (por ejemplo, Zeonpax® de Hoffmann-La Roche Inc., y Simulet de Novartis, Inc.) o análogos de los mismos, ciclofosfamida, talidomida, azatioprina, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, daclizumab (anti-interleucina (IL)-2), infliximab (anti-factor de necrosis tumoral), MEDI-205 (anti-CD2), abx-cb1 (anti-CD147)) y anticuerpos policlonales (por ejemplo, ATG (globulina anti-timocitos)).

15 Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas de BLYS y/o APRIL, tales como anticuerpos de unión a BLYS utilizados como se describe en la presente memoria se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como olivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG)).

La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citocina o un agente inmunosupresor (por ej., uno que actúe sobre los linfocitos T, tales como la ciclosporina o un anticuerpo que se une a los linfocitos T, por ej., uno que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con las mismas vías de administración que las descritas en la presente memoria o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, matrices que están en forma de artículos conformados, por ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente US-3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y utilizar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los

inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero podrían existir algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius y la presión es la atmosférica o cercana a la atmosférica.

EJEMPLO 1: ENSAYO PARA MEDIR LAS CONCENTRACIONES DE HT

10 Reactivos: Anticuerpo anti-APRIL conjugado con perlas (ZGEN, anticuerpo anti-APRIL E9617 (clon 319.6.8.5) conjugado con perlas BioRad xMap 106 (Hercules, CA), anticuerpo anti-BLyS biotinilado (ZGEN anticuerpo anti-BLyS E4731 (clon 258.2.1.9.1.3)), estreptavidina-PE (Jackson ImmunoResearch. Labs, Inc (West Grove, PA), placas multipantalla # 016-110-084 (Millipore (Billerica, MA), (MABVN1250), ELISA B (ELISA C + BSA 1 % + NaAz), patrón de heterotrímero ABRIL/BLyS LOTE A1642F (25 ng/ml), CC1 (7,5 ng/ml) y CC2 (500 pg/ml) (2 subunidades de APRIL, una de BLyS), muestras de suero AB humano (seleccionadas previamente para un contenido bajo de BLyS y APRIL), agitador

- 1) Mantener los reactivos a temperatura ambiente
- 2) Bloquear la placa: añadir 100 µl de ELISA B a todos los pocillos, agitar durante 10', vacío.
- 3) Agitar con vórtex las perlas 30", sonicar las perlas 30"

- a. Determinar el volumen de perlas a añadir: 5K perlas/pocillo en 25 µl/pocillo de ELISA B
- b. Para un plato lleno 2,5 ml + 5E5 perlas

- 4) Añadir 25 µl de la mezcla de perlas por pocillo a todos los pocillos.
- 5) Diluir los patrones: Diluir el patrón A1642F (25 ng/ml) en ELISA B, 1:3 y seis veces para una serie de dilución de 7 puntos: 25000, 8333, 2778, 926, 309, 103 y 34 pg/ml.
- 6) Añadir 25 µl de patrón 25000 pg/ml a A1, patrón 8333 pg/ml a B1, etc.
- 7) Añadir 25 µl de CC1 a A2, añadir 25 µl de CC2 a B2.
- 8) Añadir 25 µl de suero a todos los pocillos de patrón, fondo y CC.
- 9) Añadir 25 µl de ELISA B a todos los pocillos de muestra y al pocillo de fondo.
- 10) Añadir 25 µl de muestra de suero a cada pocillo de muestra *, **.
- 11) Sellar la placa y cubrirla con papel de aluminio. Colocar en un agitador a 600 rpm durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Hacer el vacío. Lavar la placa con 2x100 µl de ELISA B.
- 13) Añadir 25 µl/pocillo de anticuerpo E4731-biotina 1 µg/ml.
- 14) Sellar la placa y cubrirla con papel de aluminio. Colocar en un agitador a 600 rpm durante 60'
- 15) Sin lavado ni aspirado, añadir 25 µl/pocillo 1:100 de SA-PE en ELISA B.
- 16) Sellar la placa y cubrirla con papel de aluminio. Colocar en un agitador a 600 rpm durante 30'
- 17) Hacer el vacío. Lavar la placa con ELISA B 2x100 µl.
- 18) Añadir 110 µl de ELISA B por pocillo. Mezclar a 600 rpm durante 5'
- 19) Analizar en Luminex 100.

Mapa de la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25000	CC1	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
B	8333	CC2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
C	2778		1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
D	926		1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
E	309	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	S21
F	103	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
G	34	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
H	B	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16

Es muy importante analizar muestras puras y a las siguientes diluciones: 1: 4, 1:8 y 1:16. Esto es necesario para permitir que los complejos de HT nativos de disocien y no afecten al suero. La concentración sérica debe mantenerse constante durante toda la serie de dilución diluyendo muestras de suero con el patrón. El tener menos de 25 µl de suero en cada pocillo puede hacer que esos pocillos presenten valores erróneos.

- Ejemplo de rendimiento del ensayo:

	Heterotrímero pg/ml		Estadísticos	
	Esperado	Observado	%CV	Error relativo
Patrones	25000	27062	2,0%	-8,2%
	8333	8039	0,4%	3,5%
	2778	2931	3,0%	-5,5%
	926	874	3,6%	5,6%
	309	316	1,4%	-2,5%
	103	110	13,0%	-7,2%
	34	32	13,9%	7,3%
CC1	7500	7259	12,3%	3,2%
CC2	500	455	5,5%	8,9%

5 Los valores aceptables para el patrón y los controles de calidad son +/- 25 % de los valores esperados. Se espera que el LdD del ensayo sea 100 pg/ml con muestras analizadas puras (suero 100 %). El ensayo se puede realizar con precisión a 34 pg/ml.

10 El patrón utilizado en este ensayo es un HT que contiene 2 subunidades de APRIL y 1 subunidad de BLYS. Los valores absolutos del HT nativo serán diferentes si esta molécula es relativamente poco común en el suero del paciente, sin embargo, en este momento no hay evidencia de que exista sesgo alguno para cualquier combinación trimérica en particular.

EJEMPLO 2: MEDICIÓN DE HT EN SUEROS DE PACIENTES Y DE CONTROLES SANOS

15 El dominio de trimerización N-terminal ZymoZipper permitió la producción de heterotrímeros BLYS/APRIL recombinantes (HTr), que se utilizaron como patrón para desarrollar un inmunoensayo basado en perlas para cuantificar el HT nativo en suero humano tal como se describe en el Ejemplo 1. Este ensayo, junto con los ensayos ELISA específicos de BLYS y APRIL se utilizaron para medir estos 3 ligandos en sueros de controles sanos (CS; n = 79) y de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES; n = 30) y artritis reumatoide (AR; n = 29) (ver Figuras 1 y 2). La actividad biológica del HTr se comparó con la de rBLYS y rAPRIL en un ensayo de señalización de 4 h usando células Jurkat transfectadas con TACI con un gen informador NFκB/luciferasa y en un ensayo de proliferación de linfocitos B primarios humanos de 4 días.

25 Significativamente más pacientes con LES que los CS tenían HT detectable en el suero (70 % frente a 14 %, p <0,0001, prueba exacta de Fisher) y el 24 % de los pacientes con AR tenían HT detectable. En esta cohorte, las concentraciones medias de HT en suero eran 177 pg/ml (LES), 64 pg/ml (AR) y 66 pg/ml (CS). En el ensayo de TACI-Jurkat (véase el Ejemplo 4), la señalización del HTr es similar a la de BLYS o APRIL. En el ensayo de linfocitos B (véase el Ejemplo 3), los HTr son inductores menos potentes que los ligandos homotriméricos (valores CE50: 0,02 nM para BLYS, 0,17 nM para APRIL y 4,06 nm para HT). Esto probablemente refleja la expresión predominante de BAFF-R, al que nuestro HTr se une mal, en los linfocitos B circulantes. Atacept y BCMA-Ig neutralizan la actividad de los 3 ligandos en estos ensayos, mientras que BAFFR-Ig exhibe poca o ninguna inhibición de la actividad del HTr. Nuestros datos confirman que el HT nativo se encuentra elevado en los pacientes con enfermedades autoinmunitarias y demuestran que los HTr son biológicamente activos. Si el HT nativo tiene un papel distinto al de sus homólogos homotriméricos queda por determinar. Atacept inhibe la bioactividad de las 3 formas de ligando, lo cual puede resultar importante en el tratamiento clínico de la enfermedad autoinmunitaria.

40 En un segundo grupo de pacientes con LES, incluyendo 72 pacientes con LES y 42 controles sanos. Las concentraciones de BLYS y APRIL se determinaron por ELISA. Las concentraciones de HT se midieron en 36 pacientes y 25 controles usando un ensayo basado en Luminex. Los HT fueron detectados en más pacientes que en los controles (72 % frente a 32 % $\chi^2= 0,0019$).

EJEMPLO 3: ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B

45 Un vial que contiene 1×10^8 células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recogidas por aféresis congeladas se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37 °C y se resuspendió en 25 ml de medio de linfocitos B (medio RPMI-1640, suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % bovino, L-glutamina 5%, Pen/Strep 5 %) en un tubo de 50 ml. Las células se ensayaron para determinar la viabilidad usando azul de tripano (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). A continuación los linfocitos B CD19 + se aislaron por selección positiva usando microperlas recubiertas con anti-CD19 (Miltenyi Biotech). Las células recubiertas se aislaron a continuación en una columna MACS LS (Miltenyi

Biotech). Los linfocitos B se resuspendieron a una concentración final de $1,6 \times 10^6$ células/ml en medio de linfocitos B y se sembraron a $100 \mu\text{l}$ /pocillo en una placa con fondo de U de 96 pocillos (Falcon, VWR, Seattle, WA). Los ligandos de HT y homotriméricos se prepararon y se añadieron a las células en 3 diluciones a partir de 1000 ng/ml a 0 ng/ml . El volumen final fue de $200 \mu\text{l}$ /pocillo.

Las células se incubaron a continuación a 37°C en un incubador humidificado durante 72 horas. Dieciséis horas antes de la recolección, se añadió a todos los pocillos $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina. Las células se recogieron en una placa de filtro de 96 pocillos (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT) donde se recogieron usando un recolector de células (Packard) y se recogieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se secaron a 55°C durante 20-30 minutos y el fondo de los pocillos se selló con un sellador de placas opaco. A cada pocillo se añadió $0,25 \text{ ml}$ de líquido de centelleo (Microscint-O, Packard) y la placa se leyó usando un contador de centelleo de microplacas TopCount (Packard).

EJEMPLO 4: BIOENSAYO CON CÉLULAS JURKAT TRANSFECTADAS CON TAC1

El bioensayo in vitro de TAC1 utiliza una línea de células Jurkat (linfocitos T de leucemia de linfocitos T aguda humana, KZ142, el clon # 24) que ha sido transfectada con dos plásmidos. En primer lugar, la línea celular se transfectó con un plásmido que contiene un gen informador de la luciferasa bajo el control del promotor $\text{NF-}\kappa\text{B/AP-1}$ y un gen de resistencia a la neomicina. Se eligió un clon apropiado después de la selección con G418. A continuación, esta línea celular se transfectó con un plásmido que contiene el ADNc de TAC1 de longitud total bajo el control del promotor CMV (TAC1/pZP7P) y un gen resistente a puromicina. Los clones se seleccionaron con puromicina y a continuación se seleccionó una línea celular apropiada para el ensayo mediante la evaluación de la expresión de TAC1 por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales TAC1.

El ensayo se basa en el registro de la lectura de la expresión del gen de la luciferasa que se activa por la unión del ligando de ensayo (HT o BLYS homotrimérico o APRIL homotrimérico) a TAC1 en la superficie de la célula producido a partir del ADNc de TAC1.

Las células Jurkat transfectadas se propagaron en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Rosewell Memorial Park Institute, Buffalo, NY) al que se añadió SBF 10 %. Se añadió puromicina a $2 \mu\text{g/ml}$ como un reactivo selectivo para la transfección. También se añadieron a los medios piruvato de sodio y L-glutamina a los medios a un volumen del 1 %. El sustrato del sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI # E2510) y el tampón de ensayo se usaron según las instrucciones del fabricante.

El ensayo se realizó resuspendiendo las células Jurkat transfectadas en medios a $1,6 \times 10^6$ células/ml. Las células se sembraron en una placa de ensayo blanca con $50 \mu\text{l}$ por pocillo. Las muestras de ZZ-APRIL fueron llevados a una dilución adecuada y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Las diluciones se añadieron a las células, a $50 \mu\text{l}$ por pocillo. La placa se incluyó 4 horas en una incubadora a 37°C . Durante la incubación, el tampón de Steady-GLO y el sustrato se equilibró a temperatura ambiente. Después de 4 horas de incubación, la placa se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El tampón de ensayo y el sustrato se mezclaron y se añadieron a $100 \mu\text{l}$ por pocillo. Las placas se agitaron en vórtex a un ajuste bajo durante 1 minuto para mezclar, a continuación se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro con 5 segundos de integración.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Stacey R. Dillon Brandon J. Harder

<120> Concentraciones séricas de heterotrimeros BLYS/APRIL y su uso en métodos diagnósticos

<130> 054878/371388

<160> 26

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1377

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (14)...(892)

<400> 1

ES 2 578 526 T3

```

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg      49
          Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
                1                5                10

agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg      97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
          15                20                25

gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg     145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
          30                35                40

ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc     193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg
          45                50                55                60

acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc     241
Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly
          65                70                75

aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc     289
Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile
          80                85                90

tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc     337
Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu
          95                100                105

agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga     385
Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly
          110                115                120

gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag     433
Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu
          125                130                135                140

```

ES 2 578 526 T3

```

cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt 481
His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser
          145                      150                      155

gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt 529
Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys
          160                      165                      170

gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag 577
Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys
          175                      180                      185

agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt 625
Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser
          190                      195                      200

ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg 673
Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val
205                      210                      215                      220

agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag 721
Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu
          225                      230                      235

tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac 769
Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp
          240                      245                      250

ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg 817
Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu
          255                      260                      265

cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg 865
Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val
          270                      275                      280

cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcaggagggg 912
Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
285                      290

aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagagggtgg ggagagggga 972
gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga 1032
gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga 1092
ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga 1152
gggagagagg cagagagaca gagagggaga gagggacaga gagagataga gcaggaggtc 1212
ggggcactct gagtcccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcacacacct aaccacacgt 1272
gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gccccgaga gccctcctc ctggagaata 1332
aaacctttgg cagctgccct tctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1377

```

<210> 2
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 578 526 T3

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
 20 25 30
 Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
 35 40 45

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

<210> 3
 <211> 586
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (27)...(578)

10

<400> 3

ES 2 578 526 T3

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

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

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

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

cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg ccc 245

Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro
60 65 70

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

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

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

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

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

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

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

tagcaggg 586

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

5

<400> 4

ES 2 578 526 T3

aagactcaaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatcettacg tgccgcgaag 60
acacagacag cccccgtaag aaccacagaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttcaggc 180
tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
Met Leu Gln Met Ala Gly
1 5

cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284
Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
10 15 20

cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332
Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
25 30 35

cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg 380
Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala
40 45 50

att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt 428
Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val
55 60 65 70

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

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

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

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

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

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

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

gct agg taattaacca ttctgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag 820
Ala Arg

aatagatgat gtgtcagatc tctttaggat gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt 880
tttgtctct aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg 940
agcttaatgg tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga 995

ES 2 578 526 T3

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

5

<400> 6

```

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

10 <210> 7
 <211> 1149
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (173)...(1023)

20 <400> 7

```

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

```

gac tcc aca gaa agg gag cag tca cgc ott act tct tgc ott aag aaa 226
  
```

ES 2 578 526 T3

Asp	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Gln	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Cys	Leu	Lys	Lys		
		5					10					15					
aga	gaa	gaa	atg	aaa	ctg	aag	gag	tgt	ggt	tcc	atc	ctc	cca	cgg	aag	274	
Arg	Glu	Glu	Met	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Val	Ser	Ile	Leu	Pro	Arg	Lys		
	20					25				30							
gaa	agc	ccc	tct	gtc	cga	tcc	tcc	aaa	gac	gga	aag	ctg	ctg	gct	gca	322	
Glu	Ser	Pro	Ser	Val	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala		
	35			40					45					50			
acc	ttg	ctg	ctg	gca	ctg	ctg	tct	tgc	tgc	ctc	acg	gtg	gtg	tct	ttc	370	
Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Cys	Leu	Thr	Val	Val	Ser	Phe		
				55					60					65			
tac	cag	gtg	gcc	gcc	ctg	caa	ggg	gac	ctg	gcc	agc	ctc	cgg	gca	gag	418	
Tyr	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu		
			70					75					80				
ctg	cag	ggc	cac	cac	gcg	gag	aag	ctg	cca	gca	gga	gca	gga	gcc	ccc	466	
Leu	Gln	Gly	His	His	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro		
		85					90					95					
aag	gcc	ggc	ctg	gag	gaa	gct	cca	gct	gtc	acc	gcg	gga	ctg	aaa	atc	514	
Lys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile		
	100					105				110							
ttt	gaa	cca	cca	gct	cca	gga	gaa	ggc	aac	tcc	agt	cag	aac	agc	aga	562	
Phe	Glu	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg		
	115				120					125					130		
aat	aag	cgt	gcc	gtt	cag	ggt	cca	gaa	gaa	aca	gtc	act	caa	gac	tgc	610	
Asn	Lys	Arg	Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Gln	Asp	Cys		
			135					140						145			
ttg	caa	ctg	att	gca	gac	agt	gaa	aca	cca	act	ata	caa	aaa	gga	tct	658	
Leu	Gln	Leu	Ile	Ala	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Thr	Ile	Gln	Lys	Gly	Ser		
			150					155					160				
tac	aca	ttt	ggt	cca	tgg	ctt	ctc	agc	ttt	aaa	agg	gga	agt	gcc	cta	706	
Tyr	Thr	Phe	Val	Pro	Trp	Leu	Leu	Ser	Phe	Lys	Arg	Gly	Ser	Ala	Leu		
		165					170					175					
gaa	gaa	aaa	gag	aat	aaa	ata	ttg	gtc	aaa	gaa	act	ggt	tac	ttt	ttt	754	
Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Phe	Phe		
	180					185					190						
ata	tat	ggt	cag	gtt	tta	tat	act	gat	aag	acc	tac	gcc	atg	gga	cat	802	
Ile	Tyr	Gly	Gln	Val	Leu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Thr	Tyr	Ala	Met	Gly	His		
	195				200					205				210			
cta	att	cag	agg	aag	aag	gtc	cat	gtc	ttt	ggg	gat	gaa	ttg	agt	ctg	850	
Leu	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Val	His	Val	Phe	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu		
				215					220					225			
gtg	act	ttg	ttt	cga	tgt	att	caa	aat	atg	cct	gaa	aca	cta	ccc	aat	898	
Val	Thr	Leu	Phe	Arg	Cys	Ile	Gln	Asn	Met	Pro	Glu	Thr	Leu	Pro	Asn		
			230					235					240				
aat	tcc	tgc	tat	tca	gct	ggc	att	gca	aaa	ctg	gaa	gaa	gga	gat	gaa	946	
Asn	Ser	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Ile	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Asp	Glu		

ES 2 578 526 T3

```

                245                250                255
ctc caa ctt gca ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga    994
Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly
    260                265                270

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

tgtctgtagc tattttcctc cctttctctg tacctctaag aagaaagaat ctaactgaaa 1103
ataccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ccctcgagcg gccgcc                    1149

```

5
 <210> 8
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

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

```

10
 <210> 9
 <211> 185
 <212> PRT

ES 2 578 526 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

5

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 578 526 T3

```

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

          210          215          220
Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala
          225          230          235          240
Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
          245

```

5 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido de unión a BLyS

<400> 11

```

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

```

15 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión a BLyS

<400> 12

ES 2 578 526 T3

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

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

<220>
 <223> Polipéptido de unión a BLYS

10 <400> 13

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

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

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión a BLYS

<400> 14

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

25 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido de unión a BLYS

35 <400> 15

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

40 <210> 16
 <211> 1214
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Proteína de fusión TACI-Fc

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

50 <400> 16

ES 2 578 526 T3

tattaggcgcg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	
gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
30 35 40	
tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
45 50 55 60	
aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
65 70 75	
tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
80 85 90	
atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
95 100 105	

ES 2 578 526 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 578 526 T3

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

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

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

gcgcgccaat ta 1214

- <210> 17
- <211> 392
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

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

- <400> 17

ES 2 578 526 T3

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

 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 325 330 335
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 355 360 365
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 370 375 380
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

<210> 18
 <211> 1070
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

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

10

ES 2 578 526 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (17)...(1048)

5 <400> 18

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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


ES 2 578 526 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión TACI-Fc

5

<400> 19

```

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

```

10

<210> 20

<211> 1082

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Proteína de fusión TACI-Fc

<220>

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

<400> 20

5

ES 2 578 526 T3

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

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

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

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

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

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

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

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act 388
 Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 110 115 120

cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca 436
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser
 125 130 135 140

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

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

gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc 580
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 175 180 185

aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc 628
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 190 195 200

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac 676
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 205 210 215 220

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc 724
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 225 230 235

ES 2 578 526 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

taatctagag gcgcgccaat ta 1082

```

- <210> 21
- <211> 348
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

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

- <400> 21

ES 2 578 526 T3

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

<210> 22
 <211> 1109
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

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

10

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

15

<400> 22

ES 2 578 526 T3

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	
gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
30 35 40	
tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
45 50 55 60	
aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
65 70 75	
tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
80 85 90	

ES 2 578 526 T3

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
95 100 105	
ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc	388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu	
110 115 120	
agg gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca	436
Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
125 130 135 140	
gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa	484
Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
145 150 155	
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg	532
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
160 165 170	
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac	580
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
175 180 185	
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag	628
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
190 195 200	
cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac	676
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
205 210 215 220	
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa	724
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
225 230 235	
gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag	772
Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
240 245 250	
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg	820
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
255 260 265	
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc	868
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
270 275 280	
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac	916
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
285 290 295 300	
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc	964
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
305 310 315	
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc	1012
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
320 325 330	

ES 2 578 526 T3

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

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

5 <210> 23
<211> 357
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 23

ES 2 578 526 T3

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

<210> 24
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteina de fusión BAFF-R-Fc

<400> 24

5

10

ES 2 578 526 T3

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

<210> 25
 <211> 1348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (282)...(1034)

10

<400> 25

ES 2 578 526 T3

ggtacgaggc ttctagagg gactggaacc taattctcct gaggctgagg gaggggtggag 60
 ggtctcaagg caacgctggc cccacgacgg agtgccagga gcactaacag tacccttagc 120
 ttgctttcct cctccctcct ttttattttc aagttccctt ttattttctcc ttgcgtaaca 180
 accttcttcc cttctgcacc actgcccgta cccttaccgg ccccgccacc tccttgctac 240
 cccactcttg aaaccacagc tgttggcagg gtccccagct c atg cca gcc tca tct 296
Met Pro Ala Ser Ser
1 5

cct ttc ttg cta gcc ccc aaa ggg cct cca ggc aac atg ggg ggc cca 344
 Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly Asn Met Gly Gly Pro
10 15 20

gtc aga gag ccg gca ctc tca gtt gcc ctc tgg ttg agt tgg ggg gca 392
 Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala
25 30 35

gct ctg ggg gcc gtg gct tgt gcc atg gct ctg ctg acc caa caa aca 440
 Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu Leu Thr Gln Gln Thr
40 45 50

gag ctg cag agc ctc agg aga gag gtg agc cgg ctg cag ggg aca gga 488
 Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Gly Thr Gly
55 60 65

ggc ccc tcc cag aat ggg gaa ggg tat ccc tgg cag agt ctc ccg gag 536
 Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp Gln Ser Leu Pro Glu
70 75 80 85

cag agt tcc gat gcc ctg gaa gcc tgg gag aat ggg gag aga tcc cgg 584
 Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg
90 95 100

aaa agg aga gca gtg ctc acc caa aaa cag aag aag cag cac tct gtc 632
 Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val
105 110 115

ctg cac ctg gtt ccc att aac gcc acc tcc aag gat gac tcc gat gtg 680
 Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val
120 125 130

aca gag gtg atg tgg caa cca gct ctt agg cgt ggg aga ggc cta cag 728
 Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln
135 140 145

gcc caa gga tat ggt gtc cga atc cag gat gct gga gtt tat ctg ctg 776
 Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu
150 155 160 165

tat agc cag gtc ctg ttt caa gac gtg act ttc acc atg ggt cag gtg 824
 Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val
170 175 180

gtg tct cga gaa ggc caa gga agg cag gag act cta ttc cga tgt ata 872
 Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile
185 190 195

ES 2 578 526 T3

```

aga agt atg ccc tcc cac ccg gac cgg gcc tac aac agc tgc tat agc 920
Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser
      200                      205                      210

gca ggt gtc ttc cat tta cac caa ggg gat att ctg agt gtc ata att 968
Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val Ile Ile
      215                      220                      225

ccc cgg gca agg gcg aaa ctt aac ctc tct cca cat gga acc ttc ctg 1016
Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu
      230                      235                      240                      245

ggg ttt gtg aaa ctg tga ttgtgttata aaaagtggct cccagcttgg 1064
Gly Phe Val Lys Leu *
                      250

aagaccaggg tgggtacata ctggagacag ccaagagctg agtatataaa ggagagggaa 1124
tgtgcaggaa cagaggcac ttcctgggtt tggtcccccg ttctcactt ttcccttttc 1184
attcccacc cctagacttt gattttacgg atatcttget tetgttcccc atggagctcc 1244
gaattcttgc gtgtgtgtag atgaggggcg ggggacgggc gccaggcatt gttcagacct 1304
ggtcggggcc cactggaagc atccagaaca gcaccacat cttta 1348

```

<210> 26
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

5

ES 2 578 526 T3

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

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *in vitro* para predecir la probabilidad de un individuo de tener lupus eritematoso sistémico (LES) mediante la detección de concentraciones elevadas del heterotrímero (HT) BLYS/APRIL en el suero de un individuo, que comprende:

10 (a) medir la concentración de HT en una muestra de suero de ensayo del individuo, en donde la detección de concentraciones elevadas del heterotrímero (HT) BLYS/APRIL comprende poner en contacto la muestra de suero con un anticuerpo inmovilizado que se une específicamente a una de las subunidades del HT y, posteriormente,

15 (b) comparar esa concentración con la concentración de HT en una muestra de suero de un control sano y
(c) determinar si la concentración de HT en la muestra de suero de ensayo se incrementa en comparación con la concentración en la muestra de suero control;

en el que dichas concentraciones elevadas de HT están asociadas al lupus eritematoso sistémico (LES).

20 2. Un método *in vitro* para predecir la probabilidad que tiene un paciente de responder a un tratamiento farmacológico para el lupus eritematoso sistémico (LES), en el que el tratamiento farmacológico comprende la inhibición de BLYS y/o APRIL, que comprende:

25 determinar la concentración del heterotrímero (HT) BLYS/APRIL en una muestra de suero del paciente, en donde la detección de las concentraciones de heterotrímero (HT) BLYS/APRIL comprende poner en contacto la muestra de suero con un anticuerpo inmovilizado que se une específicamente a una de las subunidades de HT y, posteriormente, poner en contacto las moléculas unidas a un anticuerpo detectable que se une específicamente a la otra subunidad del HT, en donde la unión a ambos anticuerpos indica la presencia del heterotrímero (HT) BLYS/ APRIL;

30 en donde la presencia de concentraciones elevadas de HT en la muestra de suero del paciente en comparación con una muestra de suero control es predictiva de la probabilidad que tiene el paciente de responder al tratamiento farmacológico para la afección.

35 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha determinación se realiza usando un ensayo basado en perlas.

4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho tratamiento farmacológico comprende un antagonista del HT que comprende una región del dominio extracelular de TACI que comprende los aminoácidos 30-110 de la SEQ ID NO: 2 fusionada en marco con una porción Fc de una inmunoglobulina.

40 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho antagonista del HT es un antagonista de BLYS.

6. El método de la reivindicación 4, en el que dicho antagonista del HT es un antagonista de APRIL.

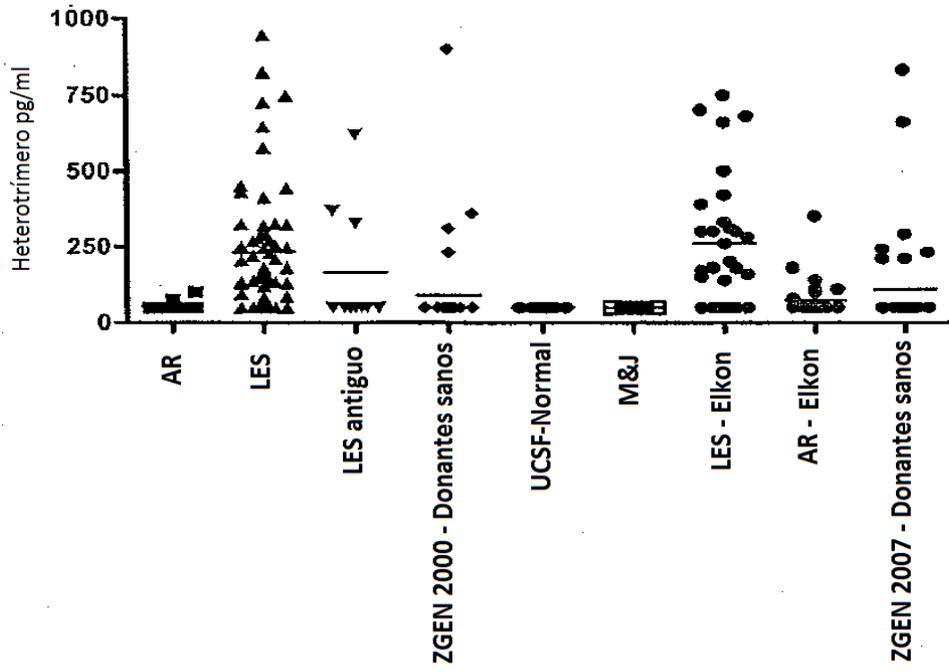


FIGURA 1

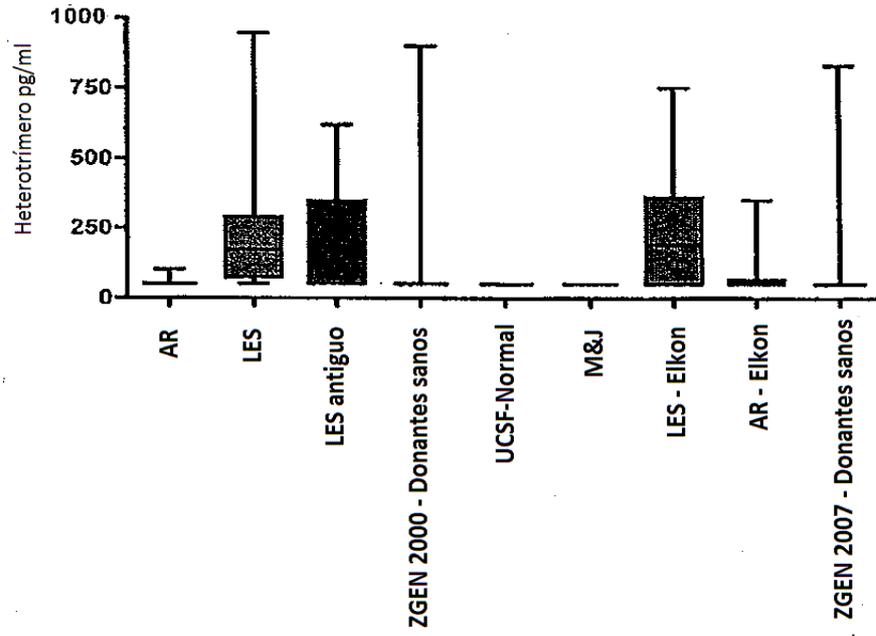


FIGURA 2

