

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 428**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014 PCT/NL2014/050612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15034364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014 E 14777903 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3041867**

54 Título: **Procedimiento para obtener péptidos de unión a april, proceso para la producción de péptidos, peptidos de unión a april obtenibles con dicho procedimiento/proceso y uso de los péptidos de unión a april**

30 Prioridad:

06.09.2013 NL 2011406

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

28.05.2020

73 Titular/es:

**ADURO BIOTECH HOLDINGS, EUROPE B.V.
(100.0%)**

**Kloosterstraat 9, RX1101
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**VAN EENENNAAM, HANS;
VAN ELSAS, ANDREA;
DRIESSEN, LILIAN y
MEDEMA, JAN PAUL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 763 428 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

Procedimiento para obtener péptidos de unión a april, proceso para la producción de péptidos, peptidos de unión a april obtenibles con dicho procedimiento/proceso y uso de los péptidos de unión a april

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere al campo de la medicina humana y veterinaria, que incluye diagnóstico médico/veterinario e investigación médica/veterinaria. Más específicamente, la presente invención se refiere a petidas de unión a APRIL, que incluyen anticuerpos monoclonales, adecuados para su uso en este u otros campos.

10

ANTECEDENTES

APRIL se expresa como una proteína transmembrana de tipo II, pero a diferencia de la mayoría de los otros miembros de la familia TNF, se procesa principalmente como una proteína secretada y se escinde en el aparato de Golgi donde es escindida por una furina convertasa para liberar una forma activa soluble (Lopez-Fraga y col., 2001, EMBO Rep 2: 945-51.). APRIL se ensambla como un homo-trimero unido de forma no covalente con una homología estructural similar en el pliegue proteico con otros ligandos de la familia TNF (Wallweber y col., 2004, Mol Biol 343, 283-90) APRIL se une a dos receptores de TNF: Antígeno de maduración de células B (BCMA) y activador transmembrana y modulador de calcio e interaccionador de ligandos de ciclofilina (TACI) (revisado en Kimberley y col., 2009, J Cell Physiol. 218 (1): 1-8) Además, recientemente se ha demostrado que APRIL se une a los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) (Hendriks y col., 2005, Cell Death Differ 12, 637-48) Se ha demostrado que APRIL tiene un papel en la señalización de las células B e impulsa la proliferación y la supervivencia de las células B humanas y murinas *in vitro* (revisado en Kimberley y col., 2009, J Cell Physiol. 218 (1): 1-8).

25 APRIL se expresa predominantemente por subconjuntos de células inmunes como monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células B y células T, muchas de las cuales también expresan BAFF. Además, APRIL puede expresarse mediante células no inmunes, como osteoclastos, células epiteliales y una variedad de tejidos tumorales (revisado en Kimberley y col., 2009, J Cell Physiol. 218 (1): 1-8). De hecho, APRIL se identificó originalmente en función de su expresión en células cancerosas (Hahne y col., 1998, J Exp Med 188, 1185-90). Se encontraron altos niveles de expresión de ARNm de APRIL en un panel de líneas celulares tumorales, así como en tumores primarios humanos como el colon y un carcinoma linfóide.

Un estudio retrospectivo en 95 pacientes CLL con leucemia linfocítica crónica (CLL) mostró niveles aumentados de APRIL en suero, lo que se correlacionó con la progresión de la enfermedad y la supervivencia general del paciente, con un peor pronóstico para pacientes con niveles séricos altos de APRIL (Planelles y col., 2007, Haematologica 92, 1284-5). De manera similar, (niveles elevados de) APRIL se expresó en el linfoma de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin (NHL) y el mieloma múltiple (MM) (revisado en Kimberley y col., 2009, J Cell Physiol. 218 (1): 1-8). Un estudio retrospectivo en pacientes con DLBCL (NHL) mostró que la alta expresión de APRIL en lesiones cancerosas se correlacionó con una tasa de supervivencia deficiente (Schwaller y col., 2007, Blood 109, 331-8). Recientemente, se demostró que los niveles séricos de APRIL en suero de pacientes que padecen cáncer colorrectal tienen un valor diagnóstico positivo (Ding y col., 2013, Clin. Biochemistry, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.008>)

Debido a su papel en la biología de las células B, APRIL también desempeña un papel en muchas enfermedades autoinmunes. Se han notificado niveles séricos elevados de APRIL en muchos pacientes con LES (Koyama y col., 2005, Ann Rheum Dis 64, 1065-7). Un análisis retrospectivo reveló que los niveles séricos de APRIL tendían a correlacionarse con los títulos de anticuerpos anti-dsDNA. También en el líquido sinovial de pacientes con artritis inflamatoria se detectaron niveles de APRIL significativamente mayores en comparación con aquellos con pacientes que sufren de artritis no inflamatoria como la osteoartritis (Stohl y col., 2006, Endocr Metab Immune Disord Dismune Drug Targets 6, 351-8; Tan y col., 2003, Arthritis Rheum 48, 982-92).

50

Varios estudios se centraron en la presencia de APRIL en el suero de pacientes que padecen una gama más amplia de enfermedades reumáticas de base inmunológica sistémica (que ahora también incluyen el síndrome de Sjögren, el síndrome de Reiter, la artritis psoriásica, la polimiositis y la espondilitis anquilosante) y encontraron niveles de APRIL significativamente aumentados en estos pacientes, lo que sugiere un papel importante para APRIL en estas enfermedades también (Jonsson y col., 1986, Scand J Rheumatol Suppl 61, 166-9; Roschke y col., 2002, J Immunol 169, 4314-21). Además, se detectaron niveles séricos aumentados de APRIL en suero de pacientes que sufrían dermatitis atópica (Matsushita y col., 2007, Exp. Dermatología 17, 197-202). Además, los niveles séricos de APRIL están elevados en la sepsis y predicen la mortalidad en pacientes críticos (Roderburg y col., J. Critical Care, 2013,

55

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2012.11.007>). Finalmente, el aumento de la expresión de APRIL también se ha relacionado con la esclerosis múltiple (EM). Se descubrió que la expresión de APRIL aumentaba en los astrocitos de los pacientes con EM en comparación con los controles normales. Esto está en línea con la expresión de APRIL descrita en glioblastomas y en el suero de pacientes con glioblastoma (Deshayes y col., 2004, Oncogene 23, 3005-5 12; Roth y col., 2001, Cell Death Differ 8, 403-10).

Los documentos WO 2010/100056 y Guadagnoli y col. (Blood, 2011 (117): 6856-6865) describen anticuerpos anti-APRIL que compiten con la unión a APRIL con los receptores BCMA y TACI.

10 El documento WO 2007/039489 describe el anticuerpo APRILY-2, que se usa en inmunohistoquímica y transferencia Western.

El documento EP0475784 describe anticuerpos que se unen a complejos de receptor de ligando y ligando objetivo pero no se unen significativamente al receptor de ligando y que se unen al ligando objetivo con una afinidad
15 sustancialmente menor que el complejo.

RESUMEN

Con APRIL representando un marcador importante para enfermedades, tales como, pero no limitadas a enfermedades
20 autoinmunes, enfermedades inflamatorias y tumores malignos, la detección de APRIL en el suero de sujetos humanos es importante. Los ensayos disponibles actuales implican el uso de anticuerpos policlonales (mal definidos y limitados disponibles) (Planelles y col., 2007, Haematologica 92, 1284-5), no reproduzca los niveles de APRIL informados en suero y/o la cuantificación de APRIL se ve muy afectada por la presencia de suero humano (BioLegend, ver Ejemplo 1), requiere una etapa de absorción de inmunoglobulina antes de la evaluación de los niveles de proteína APRIL
25 (Matsushita y col., 2007, Exp. Dermatología 17, 197-202) o demostrar límites de detección limitados (sistemas de R + D). En vista de las deficiencias de los anticuerpos anti-APRIL de la técnica anterior, los inventores de la presente invención se propusieron desarrollar procedimientos para identificar y obtener péptidos de unión a APRIL adecuados para detectar APRIL en el contexto de una muestra humana, preferentemente una muestra derivada de sangre tal como una muestra de suero. En particular, se diseñaron y desarrollaron procedimientos para seleccionar las células
30 B raramente abundantes que expresan los anticuerpos de ratones inmunizados con APRIL.

En resumen, el procedimiento de la invención para seleccionar anticuerpos de unión a APRIL comprende las etapas de:

35 - proporcionar una biblioteca de candidatos a anticuerpos de unión a APRIL;
- seleccionar anticuerpos de unión a APRIL de la biblioteca mediante selección por afinidad usando un péptido objetivo inmovilizado sobre un soporte sólido, comprendiendo dicho péptido objetivo una serie de epítopos de APRIL y una región de unión a receptor de APRIL de APRIL;

40 caracterizado porque el péptido objetivo es APRIL humano, que está en interacción con un péptido, el péptido protector, que comprende una región de unión a APRIL de un receptor APRIL, en el que dicho receptor APRIL es BCMA o TACI. Con este procedimiento, se pueden obtener y/o seleccionar péptidos de unión a APRIL.

El procedimiento desarrollado puede explotarse ampliamente y puede usarse para obtener una amplia gama de
45 anticuerpos de unión a APRIL.

Otros aspectos de la invención se refieren a un péptido de unión a APRIL, una célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de unión a APRIL según la invención, un proceso para producir péptidos de unión a APRIL y los péptidos de unión a APRIL obtenibles con este proceso. Además, el uso de un péptido de unión
50 a APRIL según la invención en una prueba de diagnóstico, preferentemente una prueba de diagnóstico *ex vivo*, también está dentro del alcance de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

55 Las secuencias presentadas en el listado de secuencias se relacionan con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ADN codificantes de la V_H y V_L cadenas de cinco inmunoglobulinas (hAPRIL.130, hAPRIL.132, hAPRIL.133, hAPRIL.135, hAPRIL.138) obtenidas con el procedimiento de la invención. Además, se presentan las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de ambas cadenas V_H y V_L de estas inmunoglobulinas. La Tabla 1 a continuación correlaciona las ID de secuencia con su secuencia respectiva.

60

Tabla 1

ES 2 763 428 T3

SEQ ID NO:	Descripción
1	hAPRIL.130 región variable de cadena pesada (ADN)
2	hAPRIL.130 región variable de cadena ligera (ADN)
3	hAPRIL.130 región variable de cadena pesada (AA)
4	hAPRIL.130 región variable de cadena ligera (AA)
5	HAPRIL.130 cadena pesada CDR1 (AA)
6	HAPRIL.130 cadena pesada CDR2 (AA)
7	HAPRIL.130 cadena pesada CDR3 (AA)
8	HAPRIL.130 cadena ligera CDR1 (AA)
9	HAPRIL.130 cadena ligera CDR2 (AA)
10	HAPRIL.130 cadena ligera CDR3 (AA)
11	hAPRIL.132 región variable de cadena pesada (ADN)
12	hAPRIL.132 región variable de cadena ligera (ADN)
13	hAPRIL.132 región variable de cadena pesada (AA)
14	hAPRIL.132 región variable de cadena ligera (AA)
15	hAPRIL.132 cadena pesada CDR1 (AA)
16	hAPRIL.132 cadena pesada CDR2 (AA)
17	hRRIL.132 cadena pesada CDR3 (AA)
18	hAPRIL.132 cadena ligera CDR1 (AA)
19	hAPRIL.132 cadena ligera CDR2 (AA)
20	hAPRIL.132 cadena ligera CDR3 (AA)
21	hAPRIL.133 región variable de cadena pesada (ADN)
22	hAPRIL.133 región variable de cadena ligera (ADN)
23	hAPRIL.133 región variable de cadena pesada (AA)
24	hAPRIL.133 región variable de la cadena ligera (AA)
25	hAPRIL.133 cadena pesada CDR1 (AA)
26	hARRIL.133 cadena pesada CDR2 (AA)
27	hAPRIL.133 cadena pesada CDR3 (AA)
28	hAPRIL.133 cadena ligera CDR1 (AA)
29	hAPRIL.133 cadena ligera CDR2 (AA)
30	hAPRIL.133 cadena ligera CDR3 (AA)
31	hAPRIL.135 región variable de cadena pesada (ADN)
32	hAPRIL.135 región variable de cadena ligera (ADN)
33	hAPRIL.135 región variable de cadena pesada (AA)
34	hAPRIL.135 región variable de cadena ligera (AA)
35	HAPRIL.135 cadena pesada CDR1 (AA)
36	hAPRIL.135 cadena pesada CDR2 (AA)
37	hAPRIL.135 cadena pesada CDR3 (AA)
38	HAPRIL.135 cadena ligera CDR1 (AA)

SEQ ID NO:	Descripción
39	HAPRIL.135 cadena ligera CDR2 (AA)
40	HAPRIL.135 cadena ligera CDR3 (AA)
41	hAPRIL.138 región variable de cadena pesada (ADN)
42	hAPRIL.138 región variable de cadena ligera (ADN)
43	hAPRIL.138 región variable de cadena pesada (AA)
44	hAPRIL.138 región variable de cadena ligera (AA)
45	hAPRIL.138 cadena pesada CDR1 (AA)
46	hAPRIL.138 cadena pesada CDR2 (AA)
47	hARRIL.138 cadena pesada CDR3 (AA)
48	HAPRIL.138 cadena ligera CDR1 (AA)
49	HAPRIL.138 cadena ligera CDR2 (AA)
50	HAPRIL.138 cadena ligera CDR3 (AA)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** El ensayo disponible comercialmente para detectar APRIL (obtenido de Biologend) no reproduce la cuantificación de APRIL en presencia de suero. El suero humano de pacientes con cáncer colorrectal contiene cantidades variables de APRIL humano detectado por el ELISA basado en el recubrimiento BCMA-Fc y el anticuerpo policlonal para la detección (eje x, ensayo según lo descrito por Planelles y col., Haematologica. Septiembre de 2007; 92 (9): 1284-5) o según lo detectado con el Biologend ELISA comercial (eje y). La comparación entre ambos valores por paciente revela una correlación limitada como se muestra en el coeficiente de Spearman ($R = 0,5964$).

15 **Figura 2.** La cuantificación de APRIL usando ensayos disponibles actualmente en el mercado se ve afectada negativamente por la presencia de suero humano. Se generaron dos curvas estándar utilizando APRIL recombinante diluido en PBS + suero de ternera fetal al + 10 % + suero humano (HS) al + 20 % (denominado PBS-FCS-HS) o diluido en PBS / BSA al 1 % (denominado PBS / BSA), a las concentraciones de 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41, 0,136 y 0,04 ng/ml. La detección de estas dos curvas estándar se determinó en los siguientes ensayos: **A)** Biologend ELISA, **B)** Recubierto con BCMA-FC y detectado con bioanticuerpos APRILY-5, **C)** Recubierto con Sasha-2 y detectado con anticuerpos APRILY-5 y **D)** I + D ELISA.

20 **Figura 3.** Estrategia de selección para identificar péptidos de unión a APRIL que permiten la detección en suero. Las DynaBeads magnéticas se cargaron con proteína recombinante BCMA-Fc, que después de un lavado exhaustivo pudo unir FLAG-APRIL recombinante.

25 **Figura 4.** Los monoclonales de APRIL de la invención detectan APRIL en presencia de suero. **A.** Los anticuerpos monoclonales de unión a APRIL se usaron para detectar APRIL en el suero de pacientes con CLL. Se utilizaron tres sueros de pacientes independientes (CLL1, CLL3 y CLL6), que demostraron cantidades variables de APRIL. Todos los anticuerpos de unión a APRIL muestran una detección similar de APRIL en los tres pacientes diferentes, independientemente de la cantidad de BCMA-Fc recubierta para capturar APRIL (compare la parte superior con la inferior para 500 ng/pocillo frente a 100 ng/pocillo BCMA-Fc). **B.** La detección de APRIL en suero de pacientes con CLL se determinó para el anticuerpo hAPRIL.133 utilizando diez muestras individuales más (CLL11-20) que demuestran cantidades variables de APRIL.

30 **Figura 5.** La cuantificación de APRIL usando BCMA-Fc y el péptido de unión a APRIL de la invención (hAPRIL.133 mAb) no se ve afectada por la presencia de suero humano. Se generaron dos curvas estándar utilizando APRIL recombinante diluido en PBS + suero de ternera fetal al + 10 % + suero humano (HS) al + 20 % (denominado PBS-FCS-HS) o diluido en PBS / BSA al 1 % (denominado PBS / BSA), a las concentraciones de 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41, 0,136 y 0,04 ng/ml.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 En el procedimiento de la invención para seleccionar péptidos de unión a APRIL se proporciona una biblioteca de

anticuerpos de unión a APRIL candidatos. El término “biblioteca” se conoce en la técnica y dentro del significado conocido de este término se puede entender que una “biblioteca de péptidos aglutinantes” significa una colección o conjunto de péptidos aglutinantes diferentes. El término “péptidos aglutinantes” o alternativamente “péptidos aglutinantes” dentro del contexto de una biblioteca de péptidos puede entenderse que se refiere a péptidos que tienen una capacidad potencial para unir otros compuestos y/o estructuras, en particular epítomos, más en particular epítomos peptídicos. Dentro de la presente invención, los péptidos aglutinantes en particular tienen una capacidad potencial de unión a APRIL.

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) y los fragmentos de unión de anticuerpos son péptidos conocidos que tienen la capacidad potencial de unirse a otros compuestos y/o estructuras, incluidos los epítomos, como los epítomos peptídicos. Por lo tanto, dentro de la presente invención se prevé proporcionar bibliotecas de anticuerpos. La persona experta sabrá cómo obtener y, por lo tanto, cómo proporcionar una biblioteca de anticuerpos.

Los anticuerpos pueden aislarse, por ejemplo, de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348: 552-554. Clackson y col., 1991, *Nature*, 352: 624-628 y Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, que describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. [Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante la combinación aleatoria de cadenas (Marks y col., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., 1993, *Nuc. Acids Res.* 21: 2265-2266)

El anticuerpo puede aislarse de bibliotecas de visualización de ARNm generadas usando técnicas descritas en Fukuda y col., 2006, *Nuc. Acids Res.*, 34: e127, que describen el aislamiento de fragmentos de anticuerpos utilizando bibliotecas de visualización de ARNm.

Alternativamente, una biblioteca de anticuerpos puede comprender una colección de linfocitos, preferentemente esplenocitos, recogidos de un mamífero, tal como un mamífero no humano, inmunizado con un agente adecuado para provocar una respuesta inmune específica de APRIL en el mamífero. La inmunización de mamíferos (no humanos) y la recolección de esplenocitos (u otros linfocitos) es una práctica común dentro del campo. El agente adecuado para provocar una respuesta inmune específica de APRIL usada para la inmunización puede ser la proteína APRIL o una parte de la misma, en particular en una forma purificada, lo más preferentemente en una forma sustancialmente pura. Alternativamente, la inmunización puede efectuarse mediante inmunización de ADN usando una secuencia de nucleótidos, preferentemente una secuencia de ADNc, que codifica APRIL o una parte de la misma. Los métodos y procedimientos para la inmunización de ADN son conocidos por la persona experta. Procedimientos ejemplares para la inmunización de ADN se presentan en los ejemplos.

Además de una biblioteca de anticuerpos, se describe una biblioteca de péptidos de unión diseñados en estructuras de proteínas que no son inmunoglobulinas. Los ejemplos de dichos andamios de proteínas incluyen, pero no se limitan a, adnectinas, anticuerpos, anticalinas y DARPins (Gebauer y Skerra, *Opinión actual Chem. Biol.*, 2009, 13: 245-255 y Caravella y Lugovskoy, *Opinión actual Chem. Biol.*, 2010, 14: 520-528) Los procedimientos de selección, por ejemplo, incluyen la presentación en fagos para identificar andamios de proteínas que expresan péptidos de unión a APRIL.

Además, se pueden proporcionar bibliotecas de péptidos combinatorios como la biblioteca de anticuerpos de unión a APRIL candidata. Por ejemplo, las bibliotecas combinatorias de una-perla-un-compuesto son bibliotecas que expresan un amplio conjunto de péptidos en las perlas, donde una perla se une a un péptido. Después de los procedimientos de selección, se recuperan las perlas y se identifica el péptido (Lam y col., *Methods*, 1996, 9: 482-93; Xiao y col., *Comb. Chem. Pantalla de alto rendimiento*, 2013, 13 de marzo (epub delante de impresión) utilizando, por ejemplo, procedimientos de espectrometría de masas.

En el procedimiento para seleccionar anticuerpos de unión a APRIL, los anticuerpos que se unen específicamente a APRIL se seleccionan de la biblioteca mediante selección por afinidad. El procedimiento de selección por afinidad utiliza un péptido objetivo inmovilizado sobre un soporte sólido. La unión “específicamente”, cuando se refiere a un ligando / receptor, anticuerpo / antígeno u otro par de unión, indica un proceso de unión que es determinante de la presencia de la proteína, por ejemplo, APRIL, en una población heterogénea de proteínas y/u otros biológicos. Por ende, en las condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

El péptido objetivo comprende varios epítomos de APRIL y una región de unión a receptor de APRIL de APRIL. Los epítomos de APRIL preferentemente son de una región fuera de la región de unión al receptor de APRIL de APRIL. Como quedará claro, el número de epítomos de APRIL y la región de unión al receptor de APRIL de APRIL se proporciona en forma de APRIL humano. Se prefiere el uso de April nativo como péptido objetivo.

Los procedimientos de selección por afinidad que usan un ligando inmovilizado para un péptido aglutinante que se va a seleccionar son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen procedimientos de panoramización o biopanning. Como se sabe y quedará claro para la persona experta, un procedimiento típico de selección por afinidad comprende tres etapas: captura, lavado e identificación de aglutinantes capturados.

Para el procedimiento de selección por afinidad empleado en el procedimiento de la presente invención, la etapa de captura implica la unión de los anticuerpos candidatos de unión a APRIL de la biblioteca con un péptido objetivo que comprende una región de unión a receptor de APRIL de APRIL. Como se sabe en la técnica, APRIL (en la actualidad) tiene dos receptores naturales conocidos, es decir, BCMA y TACI. Por lo tanto, el término receptor APRIL puede entenderse que significa BCMA o TACI. Aunque la invención en gran medida se ejemplifica con el uso de BCMA como el receptor APRIL. El uso de TACI es igualmente adecuado. Se conoce la región de APRIL involucrada en la unión a sus receptores naturales (Hymowitz y col., 2005, J. Biol. Chem 280: 7218-7227). El péptido objetivo comprende esta región de unión al receptor APRIL de APRIL en una forma que permite la unión de un receptor APRIL (o un equivalente de unión del mismo). El péptido objetivo se inmoviliza sobre un soporte sólido para permitir la identificación y/o el aislamiento de péptidos aglutinantes que interactúan específicamente con el objetivo seleccionado. El término "inmovilizado" debe entenderse como que tiene una movilidad restringida o reducida. La movilidad restringida o reducida es relativa al medio de lavado, utilizado en la etapa de lavado. El péptido objetivo "inmovilizado" no necesita estar directamente unido o interactuar con el soporte sólido. En cambio, puede tener una interacción con un compuesto o porción unida o que interactúa con el soporte sólido. Los ejemplos de medios de inmovilización de péptidos incluyen, pero no se limitan a adherencia no específica al plástico, acoplamiento de NH₂ a perlas, unión a perlas activadas por tosilo o unión a perlas de proteína A. Los procedimientos para la inmovilización de péptidos sobre soportes sólidos son claros para la persona experta.

El péptido objetivo en el procedimiento de selección por afinidad empleado en el procedimiento de la invención comprende una región de unión al receptor APRIL de APRIL y varios epítomos de APRIL. La región de unión al receptor APRIL de APRIL se presenta en forma de APRIL humano. La selección de la región de unión al receptor APRIL de APRIL y los epítomos de APRIL es tal que es posible la interacción de unión del péptido objetivo con el péptido protector. En esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, se debe entender que un número de significa uno o más, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, cada vez que se usan, a menos que se indique específicamente de manera diferente.

En el procedimiento de la invención para seleccionar anticuerpos de unión a APRIL, el péptido objetivo (que comprende una región de unión de APRIL de APRIL y varios epítomos de APRIL) se inmoviliza en el soporte sólido en interacción con un péptido protector que comprende una región de unión de APRIL de un Receptor APRIL, en el que el receptor es BCMA o TACI. La región de unión a APRIL del receptor APRIL puede presentarse en una proteína receptora APRIL completa o en una parte de una proteína receptora APRIL. La secuencia de la proteína del receptor APRIL o una parte de la misma es preferentemente de origen humano.

También se describe como una alternativa para la región de unión a APRIL de una proteína receptora de APRIL una región de unión a APRIL de un equivalente de unión a APRIL de dicha proteína de receptor APRIL. Un equivalente de unión a APRIL de una proteína del receptor de APRIL puede ser, por ejemplo, un péptido, tal como un anticuerpo, que se une a APRIL en la interfaz del receptor de APRIL-APRIL. Tales péptidos pueden seleccionarse de péptidos que interfieren con la interacción de APRIL y varios de sus receptores (BCMA o TACI). Por ejemplo, el anticuerpo hAPRIL.01A descrito en el documento WO2010 / 100056 o un análogo de los mismos. Los análogos de hAPRIL.01A son análogos de anticuerpos, en particular fragmentos de anticuerpos, como se define en esta especificación. Si un determinado péptido de unión a APRIL, como un anticuerpo de unión a APRIL, interfiere con la interacción de APRIL y un receptor de APRIL puede determinarse de conformidad con la metodología descrita en "Bloqueo del receptor" en el ejemplo 2 del documento WO2010 / 100056.

Debe observarse que el péptido objetivo puede inmovilizarse en el soporte sólido por su interacción con el péptido protector, estando dicho péptido protector inmovilizado en el soporte sólido por medios conocidos ejemplificados anteriormente.

La etapa de lavado sigue a la etapa de captura. En esta etapa, los elementos no unidos (péptidos aglutinantes y/o péptidos objetivo y/o péptidos de protección y/o cualquier otro elemento) se lavan del soporte sólido mediante el uso de un medio de lavado, tal como un líquido de lavado. Al seleccionar las condiciones de lavado, se puede seleccionar la rigurosidad de la selección. Tales procedimientos son claros para una persona experta. Por ejemplo, los procedimientos de lavado que incluyen células utilizarán solución salina tamponada con fosfato o medio de cultivo como líquido de lavado. El líquido de lavado puede incluir alto contenido de sal (por ejemplo, cloruro de sodio 1 M) o bajo contenido de sal (por ejemplo, cloruro de sodio 50 mM) para influir en la rigurosidad (fuerza iónica) de los procedimientos de lavado. El líquido de lavado también puede incluir detergentes, tales como Nonidet P-40 para influir

en la rigurosidad (resistencia hidrófoba) de los procedimientos de lavado.

En la etapa de identificación que sigue a la etapa de lavado, se identifican los anticuerpos que permanecen en interacción con el péptido objetivo después de la etapa de lavado. La etapa de identificación puede comprender la elución de anticuerpos del soporte sólido donde después de los anticuerpos eluidos pueden identificarse de cualquier manera adecuada conocida. Una persona experta puede aplicar procedimientos de espectrometría de masas para identificar péptidos, secuenciación de ARN para identificar moléculas de ARN que codifican el anticuerpo o secuenciación de ADN para identificar moléculas de ADNc que codifican el anticuerpo. Alternativamente, la identificación se puede hacer usando una porción de marcador, como un marcador fluorescente, unido a los anticuerpos o al péptido objetivo, como se hace en aplicaciones de bio-microarrays.

Según ciertas realizaciones, el procedimiento de la invención puede comprender además una etapa de selección negativa de anticuerpos para el soporte sólido y/o el péptido protector. En ciertos procedimientos de selección por afinidad, el uso de tal etapa de selección negativa puede dar como resultado que los anticuerpos de unión a APRIL tengan una especificidad mejorada para APRIL. La mejora es relativa a los anticuerpos de unión a APRIL obtenidos en procedimientos que no incluyen la etapa de selección negativa.

En la etapa de selección negativa, los anticuerpos se descartan si tienen una mayor afinidad por el péptido protector o el soporte sólido que por el péptido objetivo. La etapa de selección negativa se puede realizar antes o después de la etapa de captura usando el péptido objetivo en interacción con el péptido de protección (la etapa de captura primaria). Según ciertas realizaciones, la etapa de selección negativa se realiza antes de la etapa de captura primaria incluyendo una etapa de captura negativa que implica la unión de los anticuerpos candidatos de la biblioteca al péptido protector (inmovilizado en el soporte sólido) en ausencia del péptido objetivo. En esta etapa de preselección negativa, los anticuerpos no unidos se seleccionan para su uso en la etapa primaria. Según ciertas otras realizaciones, la etapa de selección negativa se realiza después de la etapa de captura primaria incluyendo una etapa de captura negativa que implica la unión, de los anticuerpos seleccionados en la etapa de captura primaria, al péptido protector (inmovilizado en el soporte sólido) en ausencia del péptido objetivo. En esta etapa negativa posterior a la selección, los anticuerpos no unidos se seleccionan como los anticuerpos de unión a APRIL. Para realizar una etapa de selección negativa, se prefiere que la inmovilización del péptido objetivo dependa de su interacción con el péptido protector (el péptido protector tiene una interacción más fuerte con el soporte sólido que con el péptido objetivo). En esta realización, el péptido objetivo puede ponerse en interacción con el péptido protector inmovilizado sobre el soporte sólido después de la prueba de preselección o la interacción del péptido objetivo y el péptido protector inmovilizado puede perturbarse para la etapa posterior a la selección.

En el procedimiento del método de la invención descrito anteriormente, los anticuerpos de unión a APRIL se identifican y/o aíslan. Para facilitar la producción de los anticuerpos de unión a APRIL, puede ser beneficioso determinar una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de unión a APRIL identificado y/u obtenido con el procedimiento. Esto permite la transfección de la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de unión a APRIL para producir organismos capaces de producir los anticuerpos de unión a APRIL con buena eficacia. Dependiendo de la biblioteca de anticuerpos candidatos utilizados, la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de unión a APRIL puede determinarse y/o aislarse con diversos procedimientos disponibles para la persona experta.

En caso de que la biblioteca sea una colección de linfocitos recolectados de un mamífero inmunizado, el anticuerpo de unión a APRIL será una molécula de inmunoglobulina presentada en la superficie celular de un clon de linfocitos obtenido. La secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos de unión a APRIL puede obtenerse aislando ARN de un cultivo del clon de linfocitos, amplificando selectivamente la secuencia de inmunoglobulina usando cebadores específicos de inmunoglobulina seguido de secuenciación de la secuencia amplificada selectivamente.

En caso de que la biblioteca sea una colección de fagos, el anticuerpo seleccionado será un anticuerpo o fragmento de anticuerpo presentado en la superficie del fago. El nucleótido que codifica el péptido de unión a APRIL puede aislarse aislando el ADN de los fagos aislados seguido de la secuenciación del ADN.

En caso de que la biblioteca sea una colección de ARNm que se muestran en un ribosoma, el anticuerpo seleccionado se mostrará en un ribosoma. El nucleótido que codifica el anticuerpo de unión a APRIL puede aislarse aislando el ARNm unido al ribosoma. La identidad del anticuerpo se determina mediante secuenciación directa de ARN o generación de ADNc complementario al ARNm, seguido de secuenciación de la secuencia amplificada selectivamente.

En caso de que la biblioteca sea una colección de anticuerpos unidos a perlas (biblioteca de una-perla-un-compuesto), un anticuerpo está unido a una perla. La identidad del péptido de unión a APRIL se determina recuperando los péptidos de las perlas seleccionadas en el procedimiento de selección por afinidad, seguido de procedimientos de espectrometría de masas.

Quedará claro que en el procedimiento de la invención para obtener anticuerpos de unión a APRIL, las reacciones y procesos tales como el proceso de selección de afinidad de unión y procesos asociados tales como etapas de captura y etapas de lavado pueden realizarse en un recipiente adecuado, tal como una reacción recipiente, en particular
5 recipientes utilizados a escala de laboratorio para tales procedimientos de detección.

Además se describe un péptido de unión a APRIL obtenible con el procedimiento según la invención para obtener péptidos de unión a APRIL. La invención proporciona además péptido de unión a APRIL, que comprende dominios de inmunoglobulina VH y VL, que comprende VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos
10 SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las secuencias VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 8, 9, y 10 respectivamente, o

VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 15, 16 y 17, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 18, 19, y 20 respectivamente, o
15

VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 28, 29, y 30 respectivamente, o

VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 35, 36 y 37, respectivamente, y
20 VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 38, 39, y 40 respectivamente, o

VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 45, 36 y 47, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 48, 49 y 50,

25 y que comprende un par de dominios VH y VL que tiene al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 3 y 4 o 24, o 13 y 14, o 33 y 34, o 43 y 44.

Para el experto en la materia estará claro que con el procedimiento de la invención se puede obtener un gran número
30 de anticuerpos de unión a APRIL diferentes. Los anticuerpos que se pueden obtener con el procedimiento de la invención comparten la característica común de que, en comparación con los péptidos de unión a APRIL conocidos, tienen una interferencia reducida con la unión de APRIL a sus receptores. Por lo tanto, pueden unirse mejor a APRIL en complejo con sus receptores o equivalentes de unión de los mismos, tales como hAPRIL.01A o análogos de los mismos. Los péptidos que se unen a APRIL, como los anticuerpos, de la presente invención generalmente tendrán
35 una K_D para su objetivo (APRIL, preferentemente APRIL humano) de aproximadamente menos de 10^{-3} M, más generalmente por debajo de 10^{-6} M, típicamente por debajo de 10^{-7} M, más típicamente por debajo de 10^{-8} M, preferentemente por debajo de 10^{-9} M, y más preferentemente por debajo de 10^{-10} M, y más preferentemente por debajo de 10^{-11} M (véase, por ejemplo Presta, y col., 2001, Thromb. Haemost. 85: 379-389; Yang, y col., 2001, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38: 17-23; Carnahan, y col., 2003, Clin. Cancer Res. (Supl.) 9: 3982s-3990s) Según ciertas
40 realizaciones, la K_D de los péptidos de unión a APRIL, tales como anticuerpos, de la invención para su objetivo (APRIL, preferentemente APRIL humano) pueden seleccionarse entre $1 \cdot 10^{-6}$ a $0,5 \cdot 10^{-11}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ a $0,5 \cdot 10^{-11}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ a $0,5 \cdot 10^{-11}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ a $1 \cdot 10^{-11}$ M, preferentemente $5 \cdot 10^{-9}$ a $1 \cdot 10^{-11}$ M, más preferentemente $5 \cdot 10^{-9}$ a $1 \cdot 10^{-10}$ M. Las afinidades de unión pueden determinarse usando análisis estándar. Según ciertas realizaciones, los péptidos de unión a APRIL que se pueden obtener tienen una IC50 para la inhibición de la interacción del receptor
45 APRIL-APRIL de al menos $5 \cdot 10^{-9}$ M, preferentemente por encima de $1 \cdot 10^{-8}$ M y más preferentemente por encima de $1 \cdot 10^{-7}$ M y más preferentemente por encima de $1 \cdot 10^{-6}$ M. Por ejemplo, la IC50 para la inhibición de la interacción APRIL receptor-APRIL puede ser de $5 \cdot 10^{-9}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ M, como $5 \cdot 10^{-9}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ M, preferentemente $1 \cdot 10^{-8}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ M, como $1 \cdot 10^{-8}$ a $1 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ M, o $1 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-6}$ M.

50 Según ciertas realizaciones, el péptido de unión a APRIL obtenible es una inmunoglobulina o un fragmento de unión de una inmunoglobulina. En la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas, los términos inmunoglobulina y anticuerpo se usan como sinónimos y, por lo tanto, son intercambiables. El término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que exhibe una actividad deseada, en particular la unión a un objetivo. Al unirse al objetivo, se pueden promover ciertos efectos deseados. Por ejemplo, un compuesto o porción asociada, por ejemplo, al unirse con
55 el anticuerpo, puede dirigirse a la ubicación objetivo. En la presente invención, el objetivo es APRIL humano. El anticuerpo dirigido a APRIL puede unirse a APRIL cuando APRIL está unido a sus receptores o análogos de los mismos.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero no se limita a, anticuerpos
60 monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Dentro de la presente invención, un péptido derivado de cierto anticuerpo puede considerarse un análogo de anticuerpo. La persona experta comprenderá que para un

funcionamiento adecuado de un análogo de anticuerpo dentro del contexto de esta invención, un anticuerpo derivado (o análogo de anticuerpo) comprenderá regiones de unión a antígeno de su anticuerpo de origen. Los análogos de anticuerpos en particular comprenden fragmentos de anticuerpos, anticuerpos que tienen una función efectora modificada, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados como se define a continuación.

- 5 “Fragmento de anticuerpo” y “fragmento de unión a anticuerpo” significan fragmentos de unión a antígeno y partes comparables de un anticuerpo, que incluyen típicamente al menos una porción de la unión a antígeno o regiones variables del anticuerpo parental. Un fragmento de anticuerpo retiene al menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo parental. Para esto, un fragmento de anticuerpo comprende varias CDR, en particular una cantidad de CDR
- 10 de una región V_H , tales como CDR1, CDR2 y CDR3 de una región V_H . Además del número de CDR de una región V_H , un fragmento de anticuerpo también puede comprender varias CDR de una región V_L , tales como CDR1, CDR2 y CDR3 de una región V_L . Según ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos pueden comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de una región V_H en conjunción con CDR1, CDR2 y CDR3 de una región V_L . Típicamente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos el 10 % de la actividad de unión parental cuando esa actividad se expresa sobre una base
- 15 molar. Preferentemente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos el 20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de la afinidad de unión del anticuerpo parental por el objetivo. Por lo tanto, como está claro para la persona experta, los “fragmentos de anticuerpos” en muchas aplicaciones pueden sustituir a los anticuerpos y el término “anticuerpo” debe entenderse que incluye “fragmentos de anticuerpos” cuando tal sustitución es adecuada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos;
- 20 anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, sc-Fv, unicuerpos o duocuerpos (tecnología de Genmab); anticuerpos de dominio (tecnología de Domantis); nanocuerpos (tecnología de Ablynx); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Las variantes de anticuerpos diseñados se revisan en Holliger y Hudson, 2005, Nat. Biotecnología 23: 1126-1136.
- 25 Un “fragmento Fab” está compuesto por una cadena ligera y el CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región “Fc” contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de la cadena pesada se mantienen unidos por dos o más enlaces disulfuro y por

30 interacciones hidrofóbicas de los dominios C_{H3} .

Un “fragmento Fab'” contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio C_{H1} y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2} , de modo que se puede formar un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

35

Un fragmento “F(ab')₂” contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2} , de modo que se forma un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')₂ está compuesto de este modo por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

40

La “región Fv” comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes.

Un “anticuerpo Fv de cadena sencilla” (o “anticuerpo scFv”) se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden

45 los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. En general, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun, 1994, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. Véase también, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 88/01649 y U.S. Pat. N.º 4,946,

50 778 and 5,260,203.

Un “diacuerpo” es un pequeño fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L o V_L - V_H). Al utilizar un conector que es muy corto como para permitir la

55 combinación entre dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a combinarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Holliger y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90: 6444-6448.

60 Un “fragmento de anticuerpo de dominio” es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H se unen covalentemente con un conector peptídico para crear un fragmento de anticuerpo de

dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo o diferentes antígenos.

Un fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una porción suficiente de la región constante para 5 permitir la dimerización (o multimerización) de cadenas pesadas que tienen una capacidad reducida de enlace de disulfuro, por ejemplo, cuando al menos una de las cisteínas de bisagra normalmente participa en el disulfuro de cadena interpesada el enlace se altera con procedimientos conocidos disponibles para la persona experta. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las 10 funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la vida media del anticuerpo, ADCC (función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y/o unión del complemento (por ejemplo, cuando el anticuerpo tiene un perfil de glicosilación necesario para la función ADCC o la unión del complemento).

En la presente invención, el anticuerpo se dirige contra APRIL, preferiblemente APRIL humano, y por lo tanto 15 comprende dominios de unión que se unen y/o interactúan con APRIL, preferentemente APRIL humano. El anticuerpo se puede criar en un animal de una especie no humana adecuada para provocar anticuerpos contra antígenos humanos. Alternativamente, el anticuerpo puede aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348: 552-554. Clackson y col., 1991, *Nature*, 352: 624-628 y Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597. El experto en la materia podrá seleccionar una especie no humana 20 adecuada para obtener anticuerpos contra antígenos humanos. Por ejemplo, se puede hacer una selección de un mamífero no humano, como un roedor, que incluye especies murinas (ratas o ratones) o de hámster, o alternativamente una especie de camélidos.

El anticuerpo, cuando se cría en una especie no humana, preferentemente se quimeriza con procedimientos y técnicas 25 conocidas en la técnica para formar un "anticuerpo quimérico".

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u 30 homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, U.S. Pat. No. 4,816,567 and Morrison y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855). Dentro de la presente invención, un "anticuerpo quimérico" es preferentemente un "anticuerpo humanizado".

35 Como se usa en esta invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y usualmente dos, dominios variables, en los que todos o 40 sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), usualmente de una inmunoglobulina humana. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor comprenderán esencialmente las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos de roedor parentales, aunque se pueden incluir 45 ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado, o por otras razones. Sin embargo, como los intercambios de bucle CDR no resultan de manera uniforme en un anticuerpo con las mismas propiedades de unión que el anticuerpo de origen, los cambios en los residuos del marco (FR), los residuos implicados en el soporte del bucle CDR, también podrían introducirse en los anticuerpos humanizados para preservar la afinidad de unión al antígeno (Kabat y col., 1991, *J. Immunol.* 147: 1709)

50 El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos "completamente humanos", es decir, anticuerpos que comprenden solo secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos no humanas, tales como murinas (ratas o ratones) si se producen en un ratón, en una célula no humana (por ejemplo, ratón o hámster), o en un hibridoma derivado de una célula murina. De manera similar, 55 "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente. Se puede generar un anticuerpo completamente humano en un ser humano, en un animal no humano transgénico que tiene secuencias de la línea germinal de inmunoglobulina humana, mediante presentación en fagos u otros procedimientos de biología molecular. Además, las inmunoglobulinas recombinantes también pueden prepararse en ratones transgénicos. Véase Méndez y col., 1997, *Nature Genetics* 15: 60 146-156. Véase también las tecnologías Abgenix, Medarex, MeMo y Kymab.

El término "región hipervariable", como se usa en esta invención, se refiere a los residuos de aminoácidos de un

anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR", definida por alineamiento de secuencia, por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la luz dominio variable de la cadena y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (véase Kabat y col., 1991, Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland.) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (HVL), como se define estructuralmente, por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio de variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio de variable de la cadena pesada (véase Chothia y Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los residuos de la "región flanqueante" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable tal como se define en esta invención.

Un péptido de unión a APRIL, como un anticuerpo, o un análogo del mismo, comprende dominios V_H de inmunoglobulina, que comprenden secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, o SEQ ID NO: 15, 16 y 17 o SEQ ID NO: 25, 26 y 27 o SEQ ID NO: 35, 36 y 37 o SEQ ID NO: 45, 46 y 47, tal como un dominio V_H que tiene al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO 3, 13, 23, 33 o 43. Como entenderá la persona experta, el dominio V_H es principalmente dominante en la determinación de la afinidad de unión y la especificidad de los anticuerpos.

Dicho péptido de unión a APRIL, tal como un anticuerpo anti-APRIL o análogo del mismo, comprende dominios V_H y V_L de inmunoglobulina, que comprenden secuencias V_H CDR1, V_H CDR2 V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2 y V_L de CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19 y 20 o SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 y 30 o SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40 o SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 y 50, tal como un par de dominios V_H y V_L que tiene al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 3 y 4, o 13 y 14, o 23 y 24, o 33 y 34, o 43 y 44. El experto en la materia puede determinar las secuencias de ADN que codifican estas diversas secuencias sobre la base de su conocimiento del código genético. En la tabla 2 a continuación, se enumeran varias secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos V_H y V_L . Las secuencias se proporcionan en el listado de secuencias.

Como entenderá el experto, la "similitud de secuencia" se refiere al grado en que las secuencias individuales de nucleótidos o péptidos son similares. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el grado de identidad combinado con el grado de cambios conservadores. El porcentaje de "similitud de secuencia" es el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que es idéntico o conservativamente cambiado a saber, "similitud de secuencia" = (% de identidad de secuencia) + (% de cambios conservadores).

Para el propósito de esta invención, los "cambios conservadores" y la "identidad" se consideran especies del término más amplio "similitud". Por lo tanto, siempre que se usa el término secuencia "similitud" abarca la secuencia "identidad" y "cambios conservadores".

El término "identidad de secuencia" es conocido por la persona experta. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para una alineación óptima con un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico). Tal alineación puede llevarse a cabo a lo largo de las longitudes completas de las secuencias que se comparan. Alternativamente, la alineación se puede llevar a cabo en una longitud de comparación más corta, por ejemplo, más de aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/bases o aminoácidos.

A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia se encuentra ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El grado de identidad compartido entre secuencias se expresa típicamente en términos de porcentaje de identidad entre las dos secuencias y es una función del número de posiciones idénticas compartidas por residuos idénticos en las secuencias (es decir, % de identidad = número de residuos idénticos en las posiciones correspondientes/número total de posiciones x 100). Preferentemente, las dos secuencias que se comparan son de la misma o sustancialmente la misma longitud.

El porcentaje de "cambios conservadores" puede determinarse de manera similar al porcentaje de identidad de secuencia. Sin embargo, en este caso, los cambios en una ubicación específica de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que probablemente preserven las propiedades funcionales del residuo original se puntúan como si no se produjera ningún cambio.

Para las secuencias de aminoácidos, las propiedades funcionales relevantes son las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Una sustitución conservadora de un aminoácido en un polipéptido de la invención puede seleccionarse a partir de otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica de la bioquímica de proteínas que un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular (tal como carga, hidrofobicidad e hidrofilia) puede ser sustituido por otro aminoácido sin alterar sustancialmente la actividad de una proteína, particularmente en regiones de la proteína que no están directamente asociadas con la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, y col., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin / Cummings Pub. Co., p. 224 (4a edición 1987)). Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos de carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones conservadoras incluyen, por ejemplo, Lys para Arg y viceversa para mantener una carga positiva; Glu para Asp y viceversa para mantener una carga negativa; Ser para Thr y viceversa para que se mantenga un OH libre; y Gln para Asn y viceversa para mantener un -NH₂ libre.

Las sustituciones conservativas ejemplares en la secuencia de aminoácidos de los péptidos de unión a APRIL de la invención se pueden realizar de conformidad con las que se exponen a continuación como sigue:

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

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

20

Para las secuencias de nucleótidos, las propiedades funcionales relevantes son principalmente la información biológica que un determinado nucleótido lleva dentro del marco de lectura abierto de la secuencia en relación con la maquinaria de transcripción y/o traducción. Es de conocimiento común que el código genético tiene degeneración (o redundancia) y que múltiples codones pueden llevar la misma información con respecto al aminoácido para el que codifican. Por ejemplo, en ciertas especies, el aminoácido leucina está codificado por los codones UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG (o TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG para ADN), y el aminoácido serina está especificado por UCA, UCG, UCC, UCU, AGU, AGC (o TCA, TCG, TCC, TCT, AGT, AGC para ADN). Los cambios de nucleótidos que no alteran la información traducida se consideran cambios conservadores.

25

La persona experta será consciente del hecho de que varios programas informáticos diferentes, que utilizan diferentes algoritmos matemáticos, están disponibles para determinar la identidad entre dos secuencias. Por ejemplo, se puede utilizar un programa informático que utilice los algoritmos Needleman y Wunsch (Needleman y col. (1970)). Según una
 5 realización, el programa informático es el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (Accelrys Inc., San Diego, EE.UU.) Las matrices de sustitución que pueden usarse son, por ejemplo, una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, con un peso de separación de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La persona experta apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan algoritmos
 10 diferentes.

Según una realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (Accelrys Inc., San Diego, EE.UU. La matriz CMP y un peso de hueco 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
 15

En otra realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Meyers y col. (1989)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en ALIGN Query utilizando datos de secuencia del servidor Genestream IGH Montpellier Francia <http://vegajgh.mrs.fr/bin/align-guess.cgi>) usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud
 20 de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

Para la presente invención, lo más preferido es usar BLAST (Herramienta de alineación local básica) para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre las secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

25 Las consultas que utilizan los programas BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn y tBLASTx de Altschul y col. (1990) puede publicarse a través de las versiones en línea de BLAST accesibles a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativamente, se puede utilizar una versión independiente de BLAST (por ejemplo, la versión 2.2.24 (publicada el 23 de agosto de 2010)) descargable también a través del sitio web de NCBI. Preferentemente, las consultas BLAST se realizan con los siguientes parámetros. Para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre las secuencias
 30 de aminoácidos: algoritmo: blastp; tamaño de palabra: 3; matriz de puntuación: BLOSUM62; costes de espacio: Existencia: 11, Extensión: 1; ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional; filtro: desconectado; máscara: desconectada. Para determinar el porcentaje de identidad y/o similitud entre las secuencias de nucleótidos: algoritmo: blastn; tamaño de palabra: 11; coincidencias máximas en el intervalo de consulta: 0; puntajes de coincidencia/desajuste: 2, -3; costes de espacio: Existencia: 5, Extensión: 2; filtro: regiones de baja
 35 complejidad; máscara: máscara solo para la tabla de búsqueda.

El porcentaje de "cambios conservadores" puede determinarse de manera similar al porcentaje de identidad de secuencia con la ayuda de los algoritmos y programas informáticos indicados. Algunos programas informáticos, por ejemplo, BLASTp, presentan el número/porcentaje de positivos (= similitud) y el número/porcentaje de identidad. El
 40 porcentaje de cambios conservadores puede derivarse de ello restando el porcentaje de identidad del porcentaje de positivos/similitud (porcentaje de cambios conservadores = porcentaje de similitud - porcentaje de identidad).

Sobre la base de la información de secuencia disponible para el péptido de unión a APRIL, son posibles más manipulaciones. Si el péptido de unión a APRIL es un anticuerpo, el ADN del anticuerpo también puede modificarse,
 45 por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (U.S. Pat. N ° 4.816.567; Morrison y col., 1984, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 81: 6851), o uniéndose covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para material no inmunoglobulínico (por ejemplo, dominios de proteínas). Típicamente, tal material que no es inmunoglobulina se sustituye por los dominios constantes de un anticuerpo, o por los dominios
 50 variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígenos que posee una especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígenos con especificidad para un antígeno diferente.

Un anticuerpo camelizado es un anticuerpo de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de ratón. La
 55 camelización se puede realizar siguiendo el procedimiento de Tanha y col., Protein Eng Des Sel., 2006, 19: 503-9.

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que no es humana. Los residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar generalmente siguiendo el procedimiento
 60 de Winter y colaboradores (Jones y col., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann y col., 1988, Nature, 332: 323-327; Verhoeyen y col., 1988, Science 239: 1534-1536), mediante la sustitución de secuencias de CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados"

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

5 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante si es relevante una reducción de la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza al compararla con la biblioteca completa de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta como marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., 1987, J. Immunol. 151: 2296; Chothia y col., 1987, J. Mol. Biol. 196: 901) Otro procedimiento utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4285; Presta y col., 1993, J. Immunol. 151:2623).

15 Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la posible función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras e importadas, de tal forma que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una mejor afinidad por el o los antígenos objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

30 La humanización de los anticuerpos es una tarea sencilla de ingeniería de proteínas. Casi todos los anticuerpos murinos pueden humanizarse mediante injerto de CDR, lo que da como resultado la retención de la unión al antígeno. Véase, Lo, Benny, KC, editor, en Antibody Engineering: procedimientos y protocolos, volumen 248, Humana Press, Nueva Jersey, 2004.

35 Las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-APRIL humanizados se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en los ADN de los anticuerpos anti-APRIL humanizados, o mediante síntesis de péptidos. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones en, y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para los anticuerpos anti-APRIL humanizados. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales de los anticuerpos anti-APRIL humanizados, tal como el cambio del número o posición de los sitios de glicosilación.

45 Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de los polipéptidos de anticuerpos anti-APRIL humanizados que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina", según lo descrito por Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085. En la presente, un residuo o grupo de residuos objetivo son identificados (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y reemplazados por un aminoácido neutral o cargado de forma negativa (más preferentemente, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno APRIL. A continuación, las ubicaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan mediante la introducción de más variantes o variantes diferentes en los sitios de sustitución o para estos. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el escaneo de Ala o mutación aleatoria es llevada a cabo en una región o codón objetivo y las variantes de anticuerpos anti-APRIL humanizados expresadas son analizadas para la actividad deseada.

60 Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-APRIL humanizados tendrán una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de ratón original de la cadena pesada o ligera más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, y lo más preferentemente al menos el 95 %, 98 % o 99 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos humanizados, después de alinear

- las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones en el extremo N, el extremo C o internas en la secuencia peptídica deben interpretarse como que afectan a la identidad de secuencia u homología. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede
- 5 determinar con una aplicación informática como SeqMan II (DNASTAR Inc, versión 5.05). Con el uso de este programa, se pueden alinear dos secuencias que utilizan el algoritmo de alineación óptimo de Smith y Waterman (1981) (*Journal of Molecular Biology* 147: 195-197). Después de la alineación de las dos secuencias, el porcentaje de identidad se puede calcular dividiendo el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias por la longitud de las secuencias alineadas menos la longitud de todos los espacios.
- 10 Los anticuerpos que tienen las características identificadas aquí como deseables en anticuerpos anti-APRIL humanizados pueden seleccionarse para determinar la actividad biológica inhibitoria *in vitro* o afinidad de unión adecuada. Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo en APRIL humano, un ensayo de rutina de bloqueo cruzado como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane
- 15 (1988), puede ser llevado a cabo. Es probable que los anticuerpos que se unen al mismo epítipo se bloqueen de manera cruzada en tales ensayos, pero no todos los anticuerpos de bloqueo cruzado necesariamente se unirán exactamente al mismo epítipo ya que el bloqueo cruzado puede ser el resultado del impedimento estérico de la unión de anticuerpos por anticuerpos que se unen a epítopos superpuestos, o incluso epítopos no superpuestos cercanos.
- 20 Alternativamente, el mapeo de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe y col., 1995, *J. Biol. Chem* 270:1388-1394, se puede realizar para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés. "Mutagénesis de barrido de alanina", según lo descrito por Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de residuos de aminoácidos en APRIL humano también puede usarse para determinar el epítipo funcional para anticuerpos anti-APRIL de la presente invención. Otro procedimiento para mapear el epítipo de un
- 25 anticuerpo es estudiar la unión del anticuerpo a péptidos sintéticos lineales y CLIPS que se pueden cribar utilizando tarjetas mini PEPSCAN con formato de tarjeta de crédito como se describe en Medema y col. (WO / 2010/100056), Sloodstra y col. (Sloodstra y col., 1996, *Mol. Diversidad* 1: 87-96) y Timmerman y col. (Timmerman y col., 2007, *J. Mol. Recognit.* 20: 283-299). La unión de los anticuerpos a cada péptido se determina en un inmunoensayo enzimático (ELISA) basado en PEPSCAN.
- 30 Pueden obtenerse anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, mediante detección de anticuerpos generados contra APRIL para la unión al epítipo, o mediante inmunización de un animal con un péptido que comprende un fragmento de APRIL humano que comprende las secuencias del epítipo. Se podría esperar que los anticuerpos que se unen al mismo epítipo funcional exhiban
- 35 actividades biológicas similares, como el bloqueo de la unión del receptor, y tales actividades pueden confirmarse mediante ensayos funcionales de los anticuerpos.
- Se pueden obtener otros péptidos de unión a APRIL al mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, preseleccionando péptidos de unión mediante el uso de la tecnología de selección de la invención y una
- 40 biblioteca que muestra péptidos de unión. Podría esperarse que los péptidos de unión que se unen al mismo epítipo funcional exhiban actividades biológicas similares, tales como el bloqueo de la unión del receptor, y tales actividades pueden confirmarse mediante ensayos funcionales de los anticuerpos.
- Las afinidades de los péptidos de unión a APRIL para APRIL pueden determinarse usando análisis estándar. Péptidos
- 45 de unión preferidos tales como, por ejemplo, anticuerpos, son aquellos que se unen a APRIL humano con un valor de Kd inferior a aproximadamente 1×10^{-7} ; preferentemente por debajo de aproximadamente 1×10^{-8} ; más preferentemente por debajo de aproximadamente 1×10^{-9} ; y lo más preferentemente por debajo de aproximadamente 1×10^{-10} o incluso por debajo de 1×10^{-11} M.
- 50 El término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular según lo determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" o "que consta esencialmente de" puede significar un intervalo de hasta el 20 %. Además, particularmente con respecto a los sistemas
- 55 o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe suponer que el significado de "aproximadamente" o "que consta esencialmente de" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor particular.
- 60 Se puede seleccionar un anticuerpo de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Se puede usar cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También se contemplan variantes de los isotipos de IgG. Un anticuerpo humanizado puede comprender

secuencias de más de una clase o isotipo. La optimización de las secuencias de dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada se logra fácilmente mediante el rastreo de los anticuerpos en los ensayos biológicos descritos en los Ejemplos.

- 5 Del mismo modo, cualquier clase de cadena ligera puede usarse en las composiciones y procedimientos de esta invención. Específicamente, kappa, lambda o variantes de los mismos son útiles en las presentes composiciones y procedimientos.

El péptido de unión a APRIL, tal como el anticuerpo anti-APRIL o análogo de anticuerpo del mismo, de la invención
10 puede conjugarse con un marcador, tal como un marcador seleccionado de marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluyendo fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansilo, umbeliferona, luciferina, etiqueta luminal, etiqueta isoluminal, etiqueta de éster de acridinio aromático, etiqueta de imidazol, etiqueta de sal de acridimio, etiqueta de éster de oxalato, etiqueta de aequorina, 2,3-
15 dihidroftalazinedionas, biotina/avidina, etiquetas de rotación y radicales libres estables.

Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica para conjugar moléculas de proteínas con los diversos restos, incluidos los procedimientos descritos por Hunter y col., 1962, Nature 144: 945; David y col., 1974, Biochemistry 13: 1014; Pain y col., 1981, J. Immunol. Metanfetamina 40: 219; y Nygren, J., 1982, Histochem. y
20 Cytochem. 30: 407. Los procedimientos para conjugar anticuerpos y proteínas son convencionales y bien conocidos en la técnica.

Según ciertas realizaciones, el péptido de unión a APRIL que se puede obtener con el procedimiento de la invención es un péptido de unión que se puede obtener de una biblioteca de péptidos combinatoria. Tal péptido de unión a APRIL
25 no necesita basarse en una estructura de anticuerpo y, por lo tanto, puede ser un péptido que no se une a anticuerpo. Los ejemplos incluyen el péptido de unión a APRIL derivado de las bibliotecas de una-perla-un-péptido. Otros ejemplos incluyen péptidos de unión a APRIL basados en andamios de proteínas diseñados, tales como adnectinas, anticuerpos, anticalinas y DARPins.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de unión a APRIL de la invención. Como se discutió anteriormente, la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de unión a APRIL puede determinarse y/o aislarse con diferentes procedimientos, dependiendo de la biblioteca de péptidos aglutinantes utilizados. De este modo, se pueden obtener secuencias de nucleótidos que codifican un péptido de unión a APRIL de la invención. Tales secuencias de nucleótidos pueden usarse para la
35 transfección de una célula huésped. La célula, por lo tanto, puede ser una célula modificada genéticamente. En particular, la célula puede modificarse genéticamente al comprender el nucleótido que codifica el péptido de unión a APRIL como una secuencia de nucleótidos heteróloga.

La célula huésped puede ser un huésped de clonación o un huésped de expresión. Cuando se selecciona como un
40 huésped de expresión, el sistema de expresión de la célula huésped preferentemente es capaz y más preferentemente optimizado para la producción de péptidos heterólogos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La célula huésped puede ser de un organismo unicelular o de un organismo multicelular y puede seleccionarse de células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina o péptido de unión a APRIL. Para la transfección, el ADN aislado puede
45 insertarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped.

Alternativamente, también es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión de
50 cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpo. La transferencia de una matriz genética de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones con mutaciones de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al exponerlos a antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 2551; Jakobovits y col., 1993, Nature 362: 255-258; Bruggermann y col., 1993, Año en
55 inmunología 7:33; y Duchosal y col., 1992, Nature 355: 258.

Con el uso de la célula según la invención, se puede producir el péptido de unión a APRIL. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un proceso para producir un péptido de unión a APRIL que comprende el
60 suministro de células según la invención, el cultivo de dichas células y la autorización de que las células expresen y preferentemente secreten el péptido de unión a APRIL.

El péptido de unión a APRIL puede aislarse del sistema de expresión de la célula huésped y diversos procedimientos

para esto están fácilmente disponibles para la persona experta. El procedimiento específico más adecuado dependerá del sistema de expresión de la célula huésped utilizado y la persona experta podrá realizar selecciones adecuadas en función del conocimiento general común disponible.

- 5 Cuando se usan técnicas recombinantes, el péptido de unión a APRIL, por ejemplo, un anticuerpo (o análogo) puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el péptido de unión a APRIL se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los sedimentos particulados, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E.coli*. En
 10 resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el péptido de unión a APRIL se segrega en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente primero se concentran usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se pueden incluir un inhibidor de
 15 proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes inesperados.

La composición peptídica de unión a APRIL preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de
 20 afinidad una técnica de purificación particularmente ventajosa. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad para las inmunoglobulinas depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en su secuencia proteica. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas Ig.gamma1, Ig.gamma2 o Ig.gamma4 humana (Lindmark y col., 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma.3 humana (Guss y col., 1986, EMBO J 5: 1567-1575)
 25 Aunque se encuentran disponibles otras matrices, la matriz a la que se une el ligando de afinidad es más a menudo agarosa. Las matrices estables de forma mecánica, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más elevadas y períodos de procesamiento más breves que los que se podrían lograr con agarosa. Donde el péptido de unión a APRIL es un anticuerpo y comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También se encuentran disponibles otras técnicas de
 30 purificación proteica, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

35 También se describe el péptido de unión a APRIL, por ejemplo una inmunoglobulina, que incluye un fragmento de unión de una inmunoglobulina, obtenible con el proceso para la producción de un péptido de unión a APRIL. Este péptido de unión a APRIL en general tendrá una secuencia peptídica dentro de la definición del péptido de unión a APRIL obtenible con el procedimiento para obtener un péptido de unión a APRIL. Sin embargo, pueden existir diferencias con respecto a las modificaciones posteriores a la traducción, tales como los perfiles de glicosilación. Por
 40 ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos que carecen de los residuos de fucosa del núcleo muestran una mayor actividad de ADCC. La modulación de la glicosilación de patrones de anticuerpos es conocida por una persona experta. Por ejemplo, la tecnología GlycoFi permite una modulación específica de la glicosilación de anticuerpos para mostrar el nivel deseado de la función efectora Fc (Beck y col., Expert Opin Drug Discov., 2010, 5: 95-111.)

45 El péptido de unión a APRIL, obtenible con el proceso para la producción de un péptido de unión a APRIL puede ser un anticuerpo aislado. Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido 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 proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, el péptido se purificará (1) para representar al menos
 50 el 50 %, tal como al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 %, tal como, al menos el 90 % en peso de proteína en la composición que contiene el péptido, por ejemplo, según lo determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente más del 95 %, tal como al menos el 99 % en peso de proteína en la composición que contiene el péptido, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de N- secuencia de aminoácidos terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en
 55 condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las 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.

60 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en esta invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los

anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de que el anticuerpo se obtuvo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de conformidad con la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., 1975, Nature 256:495, o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento U.S. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col., 1991, Nature 352: 624-628 y Marks y col., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales en esta invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos".

Los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse según el conocimiento y la habilidad en la técnica de inyectar a los sujetos de prueba con el antígeno APRIL humano y, a continuación, generar hibridomas que expresen anticuerpos que tengan la secuencia o las características funcionales deseadas. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, con sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN.

El péptido de unión a APRIL descrito que se puede obtener con el proceso de la invención para producir un péptido de unión a APRIL, tal como un anticuerpo, o un análogo del mismo, puede comprender dominios V_H de inmunoglobulina, que comprenden secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen al menos un 60 %, tal como al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas respectivamente de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, o SEQ ID NO: 15, 16 y 17 o SEQ ID NO: 25, 26 y 27 o SEQ ID NO: 35, 36 y 37 o SEQ ID NO: 45, 46 y 47, tal como un dominio V_H que tiene al menos un 60 %, tal como al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N.º 3, 13, 23, 33 o 43.

Dicho péptido de unión a APRIL, tal como un anticuerpo anti-APRIL o análogo del mismo, puede comprender dominios V_H y V_L de inmunoglobulina, que comprenden secuencias V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2 y V_L CDR3 que tienen al menos un 60 %, tal como al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas respectivamente de la SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19 y 20 o SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 y 30 o SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40 o SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 y 50, como un par de dominio V_H y V_L que tiene al menos un 60 %, tal como al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas respectivamente de SEQ ID NO: 3 y 4, o 13 y 14, o 23 y 24, o 33 y 34, o 43 y 44. El experto en la materia puede determinar las secuencias de ADN que codifican estas diversas secuencias sobre la base de su conocimiento del código genético. En la tabla 2 a continuación, se enumeran varias secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos V_H y V_L . Las secuencias se proporcionan en el listado de secuencias.

El péptido de unión a APRIL según la invención encuentra uso como herramienta de diagnóstico y/o herramienta analítica, preferentemente para procedimientos de diagnóstico *ex vivo*. Por lo tanto, otros aspectos de la invención se refieren a tales usos del péptido de unión a APRIL. Por ejemplo, el péptido de unión a APRIL puede usarse para detectar APRIL en una muestra de un sujeto, tal como una muestra de tejido, sangre completa o una muestra derivada de sangre, tal como plasma o suero. Alternativamente, el péptido de unión a APRIL puede usarse para detectar APRIL en células específicas, tales como células derivadas de tejido, sangre o un cultivo. Tal prueba puede tener como objetivo diagnosticar una afección asociada con niveles de APRIL alterados, tal como una afección seleccionada de cánceres, afecciones asociadas con inflamación, sepsis, alergias, enfermedades autoinmunes o infecciones, como bacteriemia. La prueba se puede utilizar en el diagnóstico para determinar si un sujeto sufre o no una afección asociada con niveles de APRIL alterados. En este caso en general, se evaluará si un sujeto tiene un nivel APRIL elevado (por encima de lo normal). La norma actual para los niveles normales de APRIL en suero humano es de aproximadamente 1-10 ng/ml (Planelles y col., 2007, Haematologica 92, 1284-5). Así, dentro de la presente invención, un nivel de APRIL alterado puede ser un nivel de APRIL elevado, tal como un nivel de APRIL superior a 10 ng/ml, tal como superior a 15, 30, 50 o 100 ng/ml. O, en caso de que se conozca el nivel APRIL normal de un sujeto en particular (por ejemplo, a partir de una serie de determinaciones realizadas en un número de momentos específicos considerados como asociados con niveles APRIL normales), se puede determinar un nivel APRIL elevado en relación con el nivel normal como determinado para el tema. Alternativamente, la prueba se puede usar para evaluar el resultado de un tratamiento que recibe un sujeto para curar y/o estabilizar la afección asociada con niveles de APRIL alterados, de los cuales padece el sujeto. En este caso, en general, se evaluará si los niveles elevados de APRIL en un sujeto disminuyen o se acercan a lo que se considera normal. Será evidente que después de que un sujeto ha sido diagnosticado

positivamente de una afección asociada con niveles de APRIL alterados, en particular niveles elevados de APRIL, el diagnóstico puede continuar evaluando el resultado de un tratamiento que dicho sujeto recibe para curar y/o estabilizar la condición asociada con niveles de APRIL alterados.

- 5 Un cáncer para el que pueden ser útiles las pruebas que emplean un péptido de unión a APRIL de la invención puede seleccionarse de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, mieloblastos, promielocito, eritroleucemia monocítica mielomonocítica, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfoma de células del manto, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma de Burkitt y linfoma de células B de la zona marginal, linfoma de policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, crondrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, cáncer de colon, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, 10 cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de la vía biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, 20 carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodenglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema 25 digestivo, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (células pequeñas, células grandes), melanoma, neuroblastoma; cáncer de cavidad oral (por ejemplo, labio, lengua, boca y faringe), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de recto; cáncer del sistema respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino y cáncer 30 del sistema urinario.

Las afecciones asociadas con la inflamación para las que pueden ser útiles las pruebas que emplean un péptido de unión a APRIL de la invención son aterosclerosis, acné vulgar, enfermedad celiaca, prostatitis crónica, glomerulonefritis, hipersensibilidad, lesión por reperfusión, sarcoidosis, rechazo de trasplante, vasculitis, cistitis 35 intersticial y afecciones asociadas con la inflamación estéril, incluido el síndrome de Muckle-Wells y otros trastornos autoinflamatorios.

Otra condición para la que pueden ser útiles las pruebas que emplean un péptido de unión a APRIL de la invención es la sepsis y/o afecciones asociadas, tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). La patología 40 de la sepsis es conocida por la persona experta. En particular, la persona experta comprenderá que la sepsis puede definirse como un síndrome inducido por infección que involucra dos o más de las siguientes características de inflamación sistémica: fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia, taquicardia y taquipnea o una ventilación minuto supranormal. La persona experta también sabrá que el desarrollo de sepsis en un sujeto puede seguir un curso, que progresa desde el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ("SIRS") - negativo, a SIRS positivo, y a continuación 45 a sepsis, que después puede progresar a sepsis severa, shock séptico, disfunción orgánica múltiple ("MOD") y, en última instancia, la muerte. La sepsis también puede surgir en un sujeto infectado cuando el sujeto posteriormente desarrolla SIRS. Como tal, "sepsis" puede definirse como la respuesta sistémica del huésped a la infección con SIRS más una infección documentada. La "sepsis severa" está asociada con MOD, hipotensión, coagulación intravascular diseminada ("DIC") o anomalías de hipoperfusión, incluyendo acidosis láctica, oliguria y cambios en el estado 50 mental. El "choque séptico" se define comúnmente como la hipotensión inducida por sepsis que es resistente a la reanimación con líquidos con la presencia adicional de anomalías de hipoperfusión.

Una enfermedad autoinmune para la que pueden ser útiles las pruebas que emplean un péptido de unión a APRIL de la invención puede seleccionarse entre esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, psoriasis, enfermedad 55 de Crohn y otras enfermedades inflamatorias del intestino, como colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico (LES), encefalomiелitis autoinmune, miastenia gravis (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad mixta del tejido conectivo, polipositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad autoinmune asociada, glomerulonefritis, glomerulonefritis creciente, glomerulonefritis 60 proliferativa, penfigoide ampolloso, síndrome de Sjogren, artritis psoriásica, resistencia a la insulina, diabetes mellitus autoinmune, hepatitis autoinmune, hemofilia autoinmune, síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALPS), hepatitis autoinmune, hemofilia autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, uveoretinitis autoinmune, síndrome de

Guillain-Bare, arteriosclerosis y enfermedad de Alzheimer.

- Trastornos alérgicos ejemplares, para los cuales las pruebas que emplean un péptido de unión a APRIL de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis vernal y conjuntivitis papilar gigante; trastornos alérgicos nasales, que incluyen rinitis alérgica y sinusitis; trastornos alérgicos óticos, que incluyen picazón en la trompa de Eustaquio; trastornos alérgicos de las vías aéreas superiores e inferiores, incluido el asma intrínseco y extrínseco; trastornos alérgicos de la piel, que incluyen dermatitis, eccema y urticaria; y trastornos alérgicos del tracto gastrointestinal.
- 10 Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones incluyen VIH, hepatitis (A, B, C, D o E), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, echovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral.
- 15 Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.
- 20 Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones incluyen Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, etc.), Género Mucorales (mucor, absidia, rizofo), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum.
- 25 Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones incluyen Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lambia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi, y Nippostrongylus brasiliensis.
- 30 Para aplicaciones de diagnóstico, el péptido de unión a APRIL de la invención típicamente se unirá (directa o indirectamente) a un grupo marcador detectable, la porción de marcador. Existen numerosos restos de marcador que generalmente se pueden agrupar en las siguientes categorías: biotina, fluorocromos, radionucleótidos, enzimas, yodo y marcadores biosintéticos. Además, en caso de que el péptido de unión a APRIL sea un anticuerpo, o un análogo del mismo, la cadena Fc puede servir como una porción de marcador. Además, las cadenas Fc se pueden agregar a péptidos que no se unen a anticuerpos para servir como marcadores. Existen numerosos anticuerpos en el mercado dirigidos a las cadenas Fc de varias especies, como los anticuerpos anti-ratón y anti-humanos. Estos están disponibles con varios marcadores y pueden usarse con procedimientos conocidos para dirigir la cadena Fc de un anticuerpo anti-APRIL de la invención. Por lo tanto, en caso de que se use un anticuerpo anti-APRIL, se prefiere que sea antigénicamente diferente de otras proteínas presentes en la prueba (por ejemplo, que comprenda al menos predominantemente secuencias de proteínas de una fuente xenogénica), como APRIL y el receptor APRIL (o el equivalente vinculante del mismo). Esto facilita el direccionamiento de la cadena Fc del anticuerpo anti-APRIL con anticuerpos marcados en el proceso de detección. La persona experta sabrá que para los anticuerpos quiméricos, la cadena Fc determinará predominantemente la antigenicidad de un anticuerpo.
- 45 Según ciertas realizaciones de los procedimientos de prueba, el péptido de unión a APRIL se detecta en una muestra de un sujeto y la presencia del péptido de unión a APRIL se usa como un indicador de la presencia de APRIL. En estas realizaciones, el péptido de unión a APRIL en general se usará en una forma soluble. Según ciertas otras realizaciones de los procedimientos de prueba, el péptido de unión a APRIL se inmoviliza sobre un soporte sólido y se usa como agente de captura para capturar APRIL, o un complejo que comprende APRIL.
- 50 Por ejemplo, en un primer formato de prueba, un receptor de unión a APRIL (como BCMA o TACI) o un equivalente de unión al mismo, como hAPRIL.01A (descrito en el documento WO2010 / 100056) o un análogo puede inmovilizarse en un soporte sólido y la muestra de un sujeto, por ejemplo suero, se aplica al soporte sólido. Después del lavado (para eliminar los materiales no unidos, en particular los materiales no unidos que interfieren con la detección de APRIL), se agrega el péptido de unión a APRIL al soporte sólido y se detecta la presencia del péptido de unión a APRIL, por ejemplo, detectando la etiqueta unida al péptido de unión a APRIL o, según algunas realizaciones, mediante la adición de un anticuerpo marcado específico para una cadena Fc en el péptido de unión a APRIL. La detección puede ser cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. Se prefiere la detección cuantitativa. Los expertos en la materia conocen procedimientos y medios para detectar péptidos marcados, tales como anticuerpos marcados. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos conjugados de peroxidasa de rábano picante que se unen a la cadena Fc del anticuerpo de unión a APRIL. La conversión de sustratos cromogénicos (por ejemplo, TMB, DAB, ABTS) por la

peroxidasa de rábano picante en productos coloreados se utiliza como una medida de APRIL unido.

En un formato de diagnóstico alternativo, la prueba de diagnóstico es para detectar en una muestra de un sujeto la cantidad de APRIL en complejo con un receptor equivalente de APRIL, como hAPRIL.01A o un análogo del mismo, 5 administrado al sujeto. En este formato, la prueba puede comprender:

- proporcionar el péptido de unión a APRIL inmovilizado sobre un soporte sólido;
- aplicar la muestra al soporte sólido e incubar para permitir que el complejo presente en la muestra se una al soporte sólido;

10 - lavado:

- detectar complejos vinculados y/o detectar APRIL no complejos vinculados.

Este formato de prueba, por ejemplo, es valioso para determinar la saturación de APRIL en el suero del sujeto con bloqueadores de la interacción del receptor APRIL-APRIL. Para esto, se prefiere detectar tanto el complejo unido como la detección de APRIL no complejo unido. Esto puede lograrse mediante la detección de APRIL complejo y no complejo 15 en incubaciones separadas y/o mediante el uso de diferentes etiquetas cuando se dirige a APRIL complejo y no complejo unido. APRIL no complejo también puede determinarse en el primer formato de prueba presentado anteriormente.

20 Para detectar APRIL unido complejo y no complejo unido en la misma incubación, el complejo puede ser dirigido con un primer péptido de detección, tal como un anticuerpo, dirigido al equivalente del receptor APRIL, dicho primer péptido de detección unido a un primer marcador, y puede ser APRIL no complejo dirigido por un segundo péptido de detección, tal como un anticuerpo, dirigido a APRIL, dicho segundo péptido de detección unido a un segundo marcador, diferente del primer marcador. El segundo péptido de detección puede seleccionarse de modo que se una a la misma 25 región de APRIL que el equivalente de receptor de APRIL. Por lo tanto, puede seleccionarse como un receptor APRIL o un receptor APRIL equivalente. De hecho, con respecto a su unión a APRIL puede ser idéntico al receptor equivalente administrado al sujeto. Por lo tanto, el segundo péptido de detección puede diferir solo del equivalente del receptor, tal como hAPRIL.01A o un análogo del mismo, administrado al sujeto al tener un marcador adherido que permite la detección discriminativa de la detección del equivalente del receptor administrado al sujeto. Por ejemplo, 30 al contener una cadena Fc diferente. Dentro de la presente invención, la referencia a hAPRIL.01A incluye sus análogos, en particular análogos humanizados. Quedará claro que el segundo péptido de detección preferentemente no debería unirse a la misma región de APRIL, donde el péptido de unión a APRIL seleccionado se une a APRIL, ni su unión a APRIL debería verse afectada por la unión del péptido de unión a APRIL seleccionado.

35 La prueba obtiene un resultado de detección, tal como un valor de detección, para APRIL complejounido y/o no complejo unido. A partir de los resultados de la detección, se puede determinar el nivel de saturación de APRIL con el equivalente de receptor APRIL administrado, de modo que el resultado terapéutico del tratamiento del sujeto con el equivalente de receptor APRIL, tal como hAPRIL.01A o un análogo del mismo, se pueda evaluar.

40 En realizaciones de la prueba de diagnóstico de la invención, el péptido de unión a APRIL o el receptor de unión a APRIL (o un equivalente de unión del mismo) pueden inmovilizarse, por ejemplo, en la superficie de un recipiente de laboratorio, tal como en la superficie de los pocillos de placa de microtitulación. Quedará claro que al aplicar la muestra al soporte sólido, la muestra se aplica al péptido inmovilizado de unión a April.

45 El lavado es para eliminar el material no unido, en particular el material no unido que interfiere con la detección de APRIL, y se puede lograr con cualquier líquido de lavado adecuado conocido por la persona experta. En general se usarán soluciones acuosas. También se proporciona alguna orientación general en relación con el lavado de líquidos en relación con el procedimiento para obtener un péptido de unión a APRIL.

50 Quedará claro que en las pruebas de diagnóstico de la invención, las reacciones y procesos tales como la aplicación de la muestra al soporte sólido y la incubación para permitir que el complejo presente en la muestra se una al soporte sólido, las etapas de lavado y las etapas de detección se pueden realizar en un recipiente adecuado, tal como un recipiente de reacción, en particular recipientes utilizados a escala de laboratorio para fines de diagnóstico.

55 Los formatos de diagnóstico ejemplares descritos anteriormente implican soportes sólidos con péptidos inmovilizados. Para el experto en la materia, quedará claro que los formatos de prueba de diagnóstico también se pueden realizar completamente en solución, por ejemplo, utilizando metodologías de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), incluyendo FRET resuelto en tiempo (TR-FRET o HTRF). La persona experta sabrá cómo modificar los formatos de prueba presentados anteriormente para ejecutarlos completamente en solución, por ejemplo, 60 utilizando metodologías FRET. También en formatos de prueba completamente ejecutados en solución, los péptidos de unión a APRIL de la invención son útiles, ya que pueden usarse como un indicador de la presencia de APRIL.

La persona experta comprenderá que en los diversos formatos de prueba, la interferencia reducida de los péptidos de unión a APRIL con la interacción del receptor APRIL-APRIL es beneficiosa. Sin embargo, debe enfatizarse que el uso diagnóstico de los péptidos de la invención no se limita a estos formatos de prueba ejemplares. El potencial de los péptidos de unión a APRIL de la presente invención para su uso en aplicaciones de diagnóstico y análisis está respaldado además por los resultados presentados en la sección experimental.

Los péptidos de unión a APRIL de la presente invención también pueden emplearse en cualquier otro procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Anticuerpos Monoclonales. A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)).

Los péptidos de unión a APRIL de la invención también pueden usarse para ensayos diagnósticos *en vivo*. En general, el péptido de unión a APRIL se marca con un radionúclido para que un antígeno APRIL o las células que lo expresan puedan localizarse usando inmunogammagrafía o tomografía por emisión de positrones.

Los péptidos de unión a APRIL de la invención también pueden tener otros usos no terapéuticos. Los usos no terapéuticos para los péptidos de unión a APRIL incluyen citometría de flujo, transferencia Western, ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunohistoquímica.

Los péptidos de unión a APRIL de esta invención también pueden usarse, por ejemplo, como un reactivo de purificación por afinidad por inmovilización en una columna de Proteína A-Sepharose.

La invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que presentan realizaciones no limitantes de la invención.

25 **EJEMPLOS**

EJEMPLO 1

Los ensayos de detección de APRIL disponibles comercialmente no detectan APRIL de manera fiable en suero humano (HS)

Para detectar APRIL en suero de pacientes, se han descrito ensayos basados en ELISA que dependen de la captura de APRIL por BCMA humano y la detección del anticuerpo unido usando un anticuerpo policlonal específico de APRIL de conejo (Planelles L y col., Haematologica 2007, 92: 1284-5) Sin embargo, el anticuerpo policlonal solo está limitado y no se puede obtener de forma reproducible. Para resolver este problema, los ensayos anti-APRIL disponibles en el mercado se compararon con la detección observada con el ELISA basado en anticuerpos policlonales. Para el ELISA policlonal, las placas se recubrieron con 100 ng/pocillo de BCMA-Fc (sistemas de I + D) en tampón de recubrimiento (tampón de fosfato de sodio 0,2 M, pH = 6,5) a 4 °C. Después del recubrimiento durante la noche, las placas se lavaron tres veces con PBS más Tween 20 al 0,05 % (PBST). A continuación se bloquearon las placas a temperatura ambiente durante una hora con PBS que contenía suero humano al 10 % (diluyente de ensayo). Para el ELISA comercial se utilizaron placas pre-recubiertas (Biolegend, San Diego, EE.UU.). Se generó una curva estándar en el diluyente de ensayo usando APRIL humano recombinante (sistemas de I + D) o usando el APRIL humano recombinante proporcionado (Biolegend). Posteriormente, el suero humano de pacientes con cáncer colorrectal se diluyó diez veces en diluyente de ensayo y se probó en ambos ELISA en paralelo. La detección del APRIL unido se realizó según las instrucciones del fabricante (Biolegend) con el anticuerpo monoclonal proporcionado acoplado a la peroxidasa de rábano picante o con los anticuerpos policlonales seguido de una segunda etapa usando peroxidasa de cabra-anti-conejo (1: 1,000 en el ensayo diluyente). Las etapas de incubación de anticuerpos fueron todas durante una hora en diluyente de ensayo a temperatura ambiente y seguidos de tres lavados con PBS/0,05 % Tween 20.

Como se presenta en la Figura 1, el APRIL ELISA disponible comercialmente no reproduce los resultados del ensayo basados en el anticuerpo policlonal. En varios casos, se observó una alta detección con el ELISA policlonal, que no coincide con una alta expresión en el ELISA Biolegend. Recíprocamente, varios casos muestran una detección clara en el ELISA de bioleyenda, mientras que no se detecta APRIL en el ELISA policlonal. Un análisis de correlación que utiliza el valor R de Spearman indica una correlación muy baja de 0,5946 con un intervalo de confianza relativamente bajo. El ELISA por lo tanto no proporciona datos comparables.

Además, se determinó el efecto de la adición de suero humano a APRIL para analizar el efecto del suero humano en la cuantificación de APRIL. Se generaron dos curvas estándar que utilizan APRIL recombinante, que se produce transfectando una construcción que expresa APRIL wt en células 293T. Este APRIL recombinante se diluye en PBS + 10 % de suero de ternera fetal + 20 % de suero humano (HS) (Sigma, cat num H4522) o se diluye en PBS/1 % de BSA, a las concentraciones de 100, 33.3, 11.1, 3.7, 1,23, 0,41, 0,136 y 0,04 ng/ml. La unión de estas dos curvas estándar se probó en varios anticuerpos o kits ELISA disponibles comercialmente para determinar el efecto de la

adición de suero a la cuantificación de APRIL. Para el APRIL ELISA proporcionado por Biolegend, el kit Legend MAX ELISA con placas PRE-recubiertas (número de cat: 439307), todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Las placas se lavaron 4 veces con al menos 300 µl de tampón de lavado 1X (Wash Buffer) (proporcionado por el fabricante) por pocillo y se secó cualquier tampón residual golpeando firmemente la placa boca
5 abajo sobre papel absorbente. A continuación, se añadieron 100 µl de diluciones de curva estándar, las placas se sellaron con el sellador de placas incluido en el kit y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, mientras se agitaba a 200 rpm. Después de esta etapa, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado 1X (Wash Buffer). A continuación, se añadieron 100 µl de solución de anticuerpo de detección APRIL/TNFSF13 humano (dada por el fabricante) a cada pocillo, las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras
10 se agitaban a 200 rpm. Después de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado 1X (Wash Buffer). El anticuerpo primario se reconoció mediante la adición de 100 µl de solución de Avidina-HRP A (dada por el fabricante) a cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos mientras se agitaba. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado 1X (Wash Buffer). Los complejos unidos se visualizaron añadiendo 100 µl de solución de sustrato F (dada por el fabricante) a cada pocillo e incubación a temperatura ambiente
15 durante 15 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de parada (dada por el fabricante) a cada pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm. La Figura 2A presenta la detección reducida de APRIL en este ensayo en presencia de suero humano.

En analogía con el ensayo de anticuerpos policlonales como se describió anteriormente, se evaluó la detección de
20 APRIL usando un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente después de la captura por BCMA-Fc. En la Figura 2B, el efecto del suero humano sobre la detección de APRIL se presenta utilizando APRILY-5 como anticuerpo monoclonal de detección. Las placas ELISA se revistieron con 100 µl de 0,5 µg/ml BCMA-Fc (EBC0512081; R&D) en tampón de recubrimiento (véase más arriba) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS / Tween al 0,2 % (descrito anteriormente) y se bloquearon para usar 150 µl de PBS / BSA al 1 % durante una
25 hora a 37 °C. Después de lavar tres veces con PBS / Tween al 0,2 %, se añadieron 100 µl de las diferentes curvas estándar a cada pocillo. Las concentraciones de curva estándar se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 %. A continuación, se añadió a las placas el APRILY-5 biotinilado disponible comercialmente (ALX-804-801-C100, Enzo Life Sciences BVBA, Antwerpen, Bélgica) en 100 µl de 1 µg/ml diluido en PBS/BSA al 1 %, esto se hizo durante una hora a 37 °C. A
30 continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 %. El siguiente paso incluyó la adición de 100 µl de Streptavidin-HRP (número de cat. 890803, R&D, Reino Unido) diluido 1: 1.000 en PBS/BSA al 1 % durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y los complejos inmunes unidos se visualizaron usando 100 µl de sustrato TMB. Las reacciones se detuvieron con 100 µl 0,5 M H₂SO₄ y las absorbancias se leyeron a 450 nm. No se detectó APRIL en presencia de suero humano.

En la Figura 2C, el efecto del suero humano sobre la cuantificación de APRIL se determinó usando un ensayo ELISA que usó el anticuerpo anti-APRIL Sascha-2 disponible comercialmente para capturar APRIL y usando el bioanticuerpo
35 APRILY-5 para detectar APRIL unido. En este ensayo, las placas ELISA se recubrieron con 100 µl de anticuerpo anti-APRIL Sascha-2 (804-804-C100, Enzo Life Sciences BVBA, Antwerpen, Bélgica) en tampón de recubrimiento (véase arriba) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y se bloquearon con 150 µl de PBS/BSA al 1 % durante una hora a 37 °C. Después de lavar tres veces con PBS/Tween al 0,2 %, se incubaron 100 µl de curvas estándar. Se añadieron 100 µl de estas curvas estándar a cada pocillo, las concentraciones de la curva estándar se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 %. A continuación, el APRILY-5 disponible en el
40 mercado biotinilado se añadió a las placas en 100 µl de 1 µg/ml diluido en PBS/BSA al 1 % durante una hora a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 %. La siguiente etapa incluyó la adición de 100 µl de Streptavidin-HRP diluido 1: 1,000 en PBS / 1 % BSA durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween al 0,2 % y los complejos inmunes unidos se visualizaron mediante la adición de 100 µl de sustrato TMB. Las reacciones se detuvieron con 100 µl 0,5 M H₂SO₄ y las absorbancias se leyeron a 450. No se observó una detección fiable de APRIL en ausencia o presencia de suero humano. Finalmente, en la Figura 2D evaluamos el uso de un segundo APRIL ELISA disponible comercialmente, el Duo Set ELISA anti human APRIL/TNFSF13, (cat num DY884) de R&D Systems. Las placas se revistieron diluyendo el anticuerpo de captura (proporcionado por el fabricante, 843362) a una concentración final de 2 µg/ml diluido en PBS. Las placas de 96 pocillos se revistieron con 100 µl por pocillo y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente,
45 las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (proporcionado por el fabricante, cat num WA126). Las placas se bloquearon agregando 300 µl de diluyente de reactivo a cada pocillo (proporcionado por el fabricante, cat num DY995) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, las placas se lavaron cuatro veces. Posteriormente, se agregaron 100 µl de curvas estándar o muestras de suero. Las muestras de suero se diluyeron cinco veces en diluyente reactivo, se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron durante 2 horas a
50 temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces y se detectó APRIL en suero usando 100 µl del anticuerpo de detección (proporcionado por el fabricante, cat num 843363) diluido en diluyente de reactivo, a cada pocillo e incubado 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces. Posteriormente, se añadieron

100 µl de la dilución de trabajo de Streptavidin-HRP (cat num 890803, R&D, Reino Unido) a cada pocillo, las placas se cubrieron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces. Los complejos inmunes se visualizaron mediante la adición de 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo (proporcionado por el fabricante, DY999) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de parada a cada pocillo (DY994). El APRIL unido se detectó por densidad óptica a 450 nm. No se detectó APRIL.

Tomados en conjunto, ninguno de los ensayos ELISA disponibles comercialmente o los anticuerpos monoclonales anti-APRIL reprodujeron los resultados del ensayo obtenidos usando los anticuerpos policlonales como se describió anteriormente y todos demostraron una gran interferencia del suero humano en la cuantificación de APRIL humano.

EJEMPLO 2

Immunización y selección de anticuerpos anti-APRIL.

15

Immunización de ratones con ADNc de APRIL

Para aislar anticuerpos contra la proteína APRIL humana que permite la detección de APRIL en el contexto del suero humano, los ratones se inmunizaron con ADNc de hAPRIL. A continuación, se diseñaron y desarrollaron procedimientos de selección para aislar específicamente células B que expresan anticuerpos anti-hAPRIL que se unen a APRIL humano en interacción de unión con BCMA.

Los anticuerpos anti-hAPRIL se generaron mediante inmunización con ADNc de ratones. Primero, el ADNc que codifica el marco de lectura abierto de longitud completa de hAPRIL se subclonó en el vector pCI-neo (Promega, Madison, WI). La expresión del vector obtenido se verificó mediante transfección transitoria de pCI-neo-hAPRIL en 293 células (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) e inmunotransferencia con ratón anti-hAPRIL IgG1 Aprily-5 (1: 5,000) (Alexis, San Diego, CA), seguido de IgG1-HRP de cabra anti-ratón (1: 2,000) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Los ratones se inmunizaron mediante inmunización con pistola génica usando una pistola Helios Gene (BioRad, Hercules, CA) y balas de oro recubiertas con ADN (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron partículas de oro de 1 µm con ADNc de pCI-neo-hAPRIL y vectores de expresión comerciales para Flt3L de ratón y GM-CSF de ratón en una relación 2: 1: 1 (ambos de Aldevron, Fargo, ND). Se usó un total de 1 µg de ADN plasmídico para recubrir 500 µg de partículas de oro.

Específicamente, se inmunizaron ratones BALB/C hembra de 7-8 semanas en los oídos con una pistola de genes, recibiendo 3 ciclos de una inyección en ambos oídos. Aproximadamente, el ELISA detectó un título de 1: 800-2,400 anti-hAPRIL en suero de ratón después de tres inmunizaciones de ADN. En el ELISA, todas las etapas de incubación fueron seguidas por una etapa de lavado con PBST (PBS con Tween 20 al 0,01 %). Las inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY) se recubrieron con anticuerpo policlonal anti-FLAG de conejo (50 ng/pocillo en PBS) (Sigma, F7425) durante la noche a 4 °C y se bloquearon con suero de cabra al 10 % / PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se incubaron con sobrenadante (1:10 en PBS) de células 293T transfectadas transitoriamente con forma secretada impulsada por el promotor CMV de FLAG-hAPRIL (pCR3-hAPRIL) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubaciones con diluciones de suero de ratón e IgG anti-ratón de cabra conjugado por HRP 1: 2,000 (Southern Biotechnology) durante 1 hora cada una a temperatura ambiente. Después del lavado final con PBST, se visualizó la inmunoreactividad anti-hAPRIL con 100 µl de cromógeno estabilizado (Invitrogen, SB02). Las reacciones se detuvieron con 100 µl 0,5 M H₂SO₄ y las absorbancias se leyeron a 450 y 620 nm. Los ratones que demostraron reactividad contra hAPRIL se inmunizaron por tercera vez final y se sacrificaron cuatro días después.

Se prepararon poblaciones de células de nódulos linfáticos y bazo empobrecido en eritrocitos como se describió anteriormente (Steenbakkers y col., 1992, J. Immunol. Metanfetamina 152: 69-77; Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Repts. 19: 125-134) y congelado a -140 °C.

Selección de células B productoras de anticuerpos anti-APRIL

Para seleccionar específicamente las células B productoras de anticuerpos anti-hAPRIL que detectan APRIL en presencia de suero humano, se diseñó y desarrolló una estrategia de selección que une de manera preferencial las células B que expresan anticuerpos anti-hAPRIL que se unen a APRIL cuando están en interacción de unión con BCMA-Fc (figura 3). Dynabeads magnéticos activados con Tosyl M-450 4 × 10⁷ se incubaron (Cat 140.13) durante el fin de semana a 4 °C con 20 µg de BCMA-Fc recombinante (R&D systems, cat # 193-13C) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. A continuación, se aspiró el sobrenadante y se bloquearon las perlas con PBS/BSA al 1 % por incubación durante una hora a 4 °C. A continuación, las perlas se lavaron 3 veces con PBS/BSA al 0,1 %. Posteriormente, las perlas se incubaron con sobrenadante que contenía FLAG-APRIL (1:10 en PBS, de células 293T transfectadas

transitoriamente con forma secretada impulsada por el promotor CMV de FLAG-hAPRIL (pCR3-hAPRIL)) por incubación durante una hora a 4 °C. Finalmente, las perlas se resuspendieron en PBS/BSA al 0,1 %.

Para seleccionar clones de células B que producen anticuerpos anti-hAPRIL de bloqueo reducido, $1,4 \times 10^7$ se descongelaron los esplenocitos empobrecidos en eritrocitos. Las células B específicas de hAPRIL se seleccionaron sometiendo los esplenocitos a selección en DynaBeads magnéticos activados por tosilo complejados con APRIL-BCMA en una proporción de perlas: células de 1: 1,5. Los esplenocitos de unión específica se lavaron mediante 15 lavados con 5 ml de medio DMEM F12/P/S/10 % de BCS. A continuación, las células B seleccionadas se cultivaron como se describe por Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Reps. 19: 125-134. Brevemente, las células B seleccionadas se mezclaron con el sobrenadante de células T al 7,5 % (v/v) y 50.000 células lactantes irradiadas (2.500 RAD) EL-4 B5 en un volumen final de 200 μ l de DMEM F12 / P / S / 10 % de BCS en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos.

El día nueve, los sobrenadantes se seleccionaron para la reactividad de hAPRIL mediante ELISA. En el ELISA, todas las etapas de incubación fueron seguidas por una etapa de lavado con PBST (PBS con Tween 20 al 0,01 %). Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY) con 0,2 μ g/ml de BCMA-Fc (R&D Systems, 193-13C) en PBS, (50 μ l / pocillo en PBS) durante la noche a 4 °C y se bloquearon con PBS/1 % de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se incubaron con sobrenadante (1:10 en PBS) de células 293T transfectadas transitoriamente con forma secretada impulsada por el promotor CMV de FLAG-hAPRIL (pCR3-hAPRIL) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubaciones con 50 μ l de sobrenadante de los cultivos de la célula B e IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP 1: 5.000 (Southern Biotechnology) durante 1 hora cada uno a temperatura ambiente. Después del lavado final con PBST, se visualizó la inmunoreactividad anti-hAPRIL con 100 μ l de cromógeno estabilizado (Invitrogen, SB02). Las reacciones se detuvieron con 100 μ l 0,5 M H_2SO_4 y las absorbancias se leyeron a 450 nm. Los clones de células B que expresan anticuerpos reactivos con hAPRIL se identificaron mediante ELISA.

Posteriormente, los clones de células B de los sobrenadantes reactivos de hAPRIL se immortalizaron por mini electrofusión siguiendo procedimientos publicados (Steenbakkers y col., 1992, J. Immunol. Metanfetamina 152: 69-77; Steenbakkers y col., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-34). Específicamente, las células B se mezclaron con las células de mieloma Sp2/0-Ag14 10^6 y el suero se eliminó mediante lavado con medio DMEM F12. Las células se trataron con solución Pronase (Calbiochem, cat. n. ° 4308070.536) durante 3 minutos y se lavaron con tampón isomolar de electrofusión (Eppendorf, cat. n. ° 53702). Las electrofusiones se realizaron en una cámara de fusión de 50 μ l por un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm seguido de un pulso cuadrado de alto campo de 10 μ s, 3 kV/cm y de nuevo por un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm.

El contenido de la cámara se transfirió al medio selectivo de hibridoma y se colocó en una placa de 96 pocillos en condiciones de dilución limitante. El día 12 después de las fusiones, los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron para determinar la actividad de unión a hAPRIL, como se describió anteriormente. Cinco hibridomas que secretaban anticuerpos en el sobrenadante que reconocía hAPRIL fueron subclonados por dilución limitada para salvaguardar su integridad. Los siguientes anticuerpos anti-hAPRIL se seleccionaron para su posterior análisis: hAPRIL.130, hAPRIL.132, hAPRIL.133, hAPRIL.135, hAPRIL.138.

La estrategia de selección utilizada para identificar los péptidos de unión a APRIL (aquí una inmunoglobulina expresada en una célula B (B)) se presenta esquemáticamente en la figura 3. En esta figura esquemática, BCMA-Fc (que actúa como péptido protector) está unido (o de otro modo inmovilizado) al soporte sólido (Bead) y el péptido objetivo (APRIL) está inmovilizado en el soporte sólido por la interacción con BCMA. Sin embargo, como queda claro a partir de la descripción anterior, en realizaciones alternativas el péptido objetivo puede unirse (u otro modo inmovilizado) al soporte sólido y el péptido protector puede inmovilizarse en el soporte sólido por su interacción con el péptido objetivo.

EJEMPLO 3

Purificación y caracterización de anticuerpos anti-APRIL Estabilización de hibridomas productores de anti-APRIL y purificación de anticuerpos anti-APRIL

Se obtuvieron poblaciones de células clonales para los hibridomas de hAPRIL mediante dos rondas de diluciones limitantes. Los hibridomas estables se cultivaron en medios sin suero durante 7-10 días; se recogieron los sobrenadantes y se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa 0,22 μ m. Los anticuerpos se purificaron usando la resina mAb Select SuRe ProtA según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, cat. n. ° 17-5438). El tampón se cambió por PBS usando columnas de filtración en gel PD-10 (GE Healthcare). Los anticuerpos se cuantificaron mediante espectrofotometría. Usando un kit de prueba de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (Roche, # 11493027001), se determinó que el (sub)-isotipo de todos los anticuerpos hAPRIL fuese IgG1, Kappa.

Clonación de ADNc de inmunoglobulina

Se usaron procedimientos basados en PCR de cebador degenerado para determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables para el anticuerpo de ratón que se expresa mediante hibridoma de hAPRIL: hAPRIL.130, hAPRIL.132, hAPRIL.133, hAPRIL.135 y hAPRIL.138.

El ARN total se aisló de aproximadamente 5×10^6 células de hibridoma usando el mini kit RNeasy (Qiagen, 74106) según las instrucciones del fabricante y tratado con desoxirribonucleasa I (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizaron ADNc específicos de genes para las cadenas pesadas y ligeras usando la transcriptasa inversa M-MLV, RNase H Minus, kit mutante puntual (Promega, cat. n.º M3683) según las instrucciones del fabricante. Los genes V_H y V_L se amplificaron por PCR usando un conjunto de cebadores de Ig basados en Novagen (Novagen, San Diego, CA) y la ADN polimerasa Accuprime Pfx (Invitrogen). Todos los productos de PCR que coincidían con el tamaño de amplicón esperado de 500 pb se clonaron en el vector pCR4 TOPO (Invitrogen), y las construcciones se transformaron en células subclonadas competentes DH5 α eficientes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Los clones se cribaron mediante PCR de colonia utilizando cebadores M13 universal hacia delante y hacia atrás, y se seleccionaron al menos dos clones de cada reacción para el análisis de secuenciación de ADN. Los CDR se identificaron siguiendo las reglas de Kabat (Kabat y col., 1991. Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta edición, Publicación NIH N.º 91-3242)

Las secuencias se describen en el Listado de secuencias adjunto y se enumeran en la **Tabla 1 arriba**.

25 EJEMPLO 4**Los anticuerpos anti-APRIL detectan APRIL en suero humano y ratones transgénicos**

Para cuantificar los niveles séricos de APRIL en suero derivado de pacientes con CLL usando los anticuerpos monoclonales APRIL recientemente identificados, hAPRIL.130, hAPRIL.132, hAPRIL.133, hAPRIL.135 y hAPRIL.138, se realizó el siguiente ensayo ELISA. Las placas ELISA se revistieron con 100 μ l de 0,5 μ g/ml de BCMA-Fc (EBC0512081; R&D), en tampón de revestimiento (fosfato de sodio 0,2 M, pH = 6,5) y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y se bloquearon con 150 μ l de PBS / BSA al 1 % durante una hora a 37 °C. Después de lavar 3 veces con PBS/Tween al 0,2 %, se añadieron 100 μ l de muestras o curvas estándar. Las muestras de suero CLL se diluyeron cinco veces en PBS/10 % FCS, mientras que la curva estándar se diluyó en PBS + FCS 10 % + HS 20 %. Las muestras y las concentraciones de curva estándar se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 %. A continuación, se añadieron 100 μ l del anticuerpo monoclonal anti-APRIL a las placas a una concentración de 1 μ g/ml diluido en PBS/BSA al 1 % y se incubó durante una hora a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y se añadieron 100 μ l de IgG anti-ratón de cabra (H&L) (Southern Biotech, número de cat 1031-05), se diluyeron 1: 1.000 en PBS/BSA al 1 % y se incubaron durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y los complejos inmunes unidos se visualizaron mediante la adición de 100 μ l de sustrato TMB (TMB). La reacción se detuvo agregando una cantidad igual de ácido clorhídrico 1 M al volumen de reacción. El APRIL unido se cuantificó midiendo la densidad óptica a 450 nm. Como se muestra en la Figura 4A, todos los anticuerpos monoclonales revelaron APRIL en el suero de los pacientes en la misma medida.

A continuación, usando el anticuerpo monoclonal hAPRIL.133, el análisis se extendió usando la misma configuración de ELISA. Se analizaron muestras adicionales de 10 pacientes con LLC con cantidades variables de APRIL (Figura 4B).

Además, se estudió el efecto de la presencia de suero humano en la cuantificación de APRIL usando el formato de ensayo que utiliza la captura BCMA-Fc y el anticuerpo hAPRIL.133 para la detección. Se generaron dos curvas estándar usando APRIL recombinante, que se produce transfectando una construcción que expresa APRIL wt en células 293T. Este APRIL recombinante se diluye en PBS + 10 % de suero de ternera fetal + 20 % de suero humano (HS) (Sigma, número de cat H4522) o se diluye en PBS/1 % de BSA, a las concentraciones de 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41, 0,136 y 0,04 ng/ml. Se estableció la unión de estas dos curvas estándar (Figura 5). Las placas ELISA se revistieron con 100 μ l de 0,5 μ g / ml de BCMA-Fc (EBC0512081; R&D), en tampón de revestimiento (fosfato de sodio 0,2 M, pH = 6,5) y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y se bloquearon con 150 μ l de PBS/BSA al 1 % durante una hora a 37 °C. Después de lavar tres veces con PBS/Tween al 0,2 %, se agregaron 100 μ l de curvas estándar. Las concentraciones de curva estándar se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween al 0,2 %. A continuación, se añadieron 100 μ l del anticuerpo monoclonal anti-hAPRIL.133 a las placas a una

concentración de 1 µg/ml diluido en PBS/BSA al 1 % y se incubó durante una hora a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y se añadieron 100 µl de IgG anti-ratón de cabra (H&L) (Southern Biotech, cat num 1031-05), se diluyeron 1: 1.000 en PBS/BSA al 1 % y se incubaron durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,2 % y los complejos inmunes unidos se visualizaron mediante la adición de 100 µl de sustrato TMB (TMB). La reacción se detuvo agregando una cantidad igual de ácido clorhídrico 1 M al volumen de reacción. El APRIL unido se cuantificó por medición de OD a 450 nm. No se observa ningún efecto de la presencia de suero humano en este formato de ensayo usando péptidos de unión a APRIL obtenidos con el procedimiento de la invención.

ES 2 763 428 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BioNovion

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA OBTENER PÉPTIDOS DE UNIÓN A APRIL, PROCESO PARA PRODUCIR LOS PÉPTIDOS, PÉPTIDOS DE UNIÓN A APRIL OBTENIBLES CON DICHO PROCEDIMIENTO/PROCESO Y USO DE LOS PÉPTIDOS DE UNIÓN A APRIL

<160> 50

10

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

15 <211> 345

<212> ADN

<213> Mus musculus

20

<220> <221> fuente <222> 1..345 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
acatgcaccg tctcagggtt ctattaacc ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct      120
ccaggaaaag gtctggagtg gctgggagtg atatggggtg atggaagcac agagtataat      180
tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaagt ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccaggtact actgtgccag agatgatgat      300
<400> 1 gttatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca              345
    
```

25 <210> 2 <211> 323 <212> ADN <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..323 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgttt cagcaggaga cagggttacc      60
ataacctgca aggccggtca gagtgtgact aatgatgtag cttggtacca acagaagcca      120
gggcagtctc ctaaattgct gatatactat gcatccaatc gcttcactgg agtcctgat      180
cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttcg ccatcagcac tgtgcaggct      240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcgggtgga      300
<400> 2 ggcaccaagc tggaaatcaa acg              323
    
```

30

<210> 3 <211> 115 <212> PRT <213> Mus musculus

ES 2 763 428 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Lys Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Asp Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 <400> 3 115

<210> 4 <211> 107 <212> PRT <213> Mus musculus

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 5 <400> 4

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

Gly Tyr Gly Val Asn
 <400> 5 1 5

<210> 6 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus

<400> 6 Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

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

Asp Asp Asp Val Met Asp Tyr
 <400> 7 1 5

<210> 8 <211> 11 <212> PRT <213> Mus musculus

Lys Ala Gly Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala
 <400> 8 1 5 10

<210> 9 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr
 <400> 9 1 5

<210> 10 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
 <400> 10 1 5

ES 2 763 428 T3

<210> 11 <211> 366 <212> DNA <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..366 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

caggagcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
acttgcaactg tctctgggtt ttcattaacc agctatgggtg tacattgggtg tcgccagcct      120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatgggctg gtggaagcac aaattataac      180
5 <400> 11 tcggctctca tgtccagact gagcatcagt agagacaact ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag agaggggctt      300
gacacctcgg gcttctacta tgctatggac tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgctc      360
tcctca                                          366

```

<210> 12 <211> 323 <212> ADN <213> Mus musculus

10 <220> <221> fuente <222> 1..323 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc      60
atcagttgca gggcagggtca ggccattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca      120
ggtggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaaaat tacactcagg agtcccatca      180
agtttcagtg gcagtggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggaacaa      240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggttatacgc ttccgtacac gttoggaggg      300
<400> 12 gggaccaagc tggaaataaa acg                                          323

```

<210> 13 <211> 122 <212> PRT <213> Mus musculus

15

```

Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1      5      10      15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20     25     30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35     40     45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50     55     60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65     70     75     80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85     90     95
Arg Glu Gly Leu Asp Thr Ser Gly Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100    105    110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
<400> 13      115      120

```

<210> 14 <211> 107 <212> PRT <213> Mus musculus

ES 2 763 428 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ala Ile Ser Asn Tyr
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65          70          75          80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr
85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
<400> 14          100          105

```

<210> 15 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Ser Tyr Gly Val His
5                    <400> 15 1          5

```

<210> 16 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
10                    <400> 16 1          5          10          15

```

<210> 17 <211> 14 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Glu Gly Leu Asp Thr Ser Gly Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
<400> 17 1          5          10

```

15 <210> 18 <211> 11 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Arg Ala Gly Gln Ala Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
<400> 18 1          5          10

```

<210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
20                    <400> 19 1          5

```

<210> 20 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr Thr
25                    <400> 20 1          5

```

<210> 21 <211> 345 <212> ADN <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..345 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

30      caggtgcagt tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
      acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct      120
      ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggggtg atggaagcac agagtataat      180
      tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaagt ccaagagcca agttttctta      240
      aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccaggctact actgtgccag agatgatgat      300
      <400> 21 gttatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca      345

```

<210> 22 <211> 323 <212> ADN <213> Mus musculus

ES 2 763 428 T3

<220> <221> fuente <222> 1..323 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

    agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgttt cagcaggaga cagcattacc      60
    ataacctgca aggccgatca gagtgtgagt agtgatgtag cttggtacca acagaaggca      120
    gggcagtctc ctaaattgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccttgat      180
    cgcttcactg gcagtgata tgggacggat ttcactttcg ccatcagctc tgtgcaggct      240
    gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcggtgga      300
    <400> 22 ggcaccaagc tggaaatcaa acg                                     323
  
```

5 <210> 23 <211> 115 <212> PRT <213> Mus musculus

```

    Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
    1          5          10          15
    Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
    20          25          30
    Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
    35          40          45
    Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50          55          60
    Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Lys Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
    65          70          75
    Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
    85          90          95
    Arg Asp Asp Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
    100         105         110
    Val Ser Ser
    <400> 23          115
  
```

<210> 24 <211> 107 <212> PRT <213> Mus musculus

10

```

    Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
    1          5          10          15
    Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asp Gln Ser Val Ser Ser Asp
    20          25          30
    Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
    35          40          45
    Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50          55          60
    Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala
    65          70          75          80
    Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
    85          90          95
    Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    <400> 24          100         105
  
```

<210> 25 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus

15

```

    Gly Tyr Gly Val Asn
    <400> 25 1          5
  
```

<210> 26 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus

20

```

    Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
    <400> 26 1          5          10          15
  
```

<210> 27 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

```

    Asp Asp Asp Val Met Asp Tyr
    <400> 27 1          5
  
```

ES 2 763 428 T3

<210> 28 <211> 11 <212> PRT <213> Mus musculus

Lys Ala Asp Gln Ser Val Ser Ser Asp Val Ala
 <400> 28 1 5 10

5 <210> 29 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 <400> 29 1 5

10 <210> 30 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
 <400> 30 1 5

<210> 31 <211> 354 <212> ADN <213> Mus musculus

15 <220> <221> fuente <222> 1..354 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

caggatgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtagcac cctcacagag cctgtccatc 60
 <400> 31 acatgcactg tctctgggtt ctattatcc agatatagt tactctgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaagcac agactataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagaggca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgccag atctaactgg 300
 gagatctatg ctttggacta ttgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

20 <210> 32 <211> 335 <212> ADN <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..335 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtattgat tatgatggtg ataattatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatg ttgcatccag tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatgt ggagccgtac 300
 <400> 32 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacg 335

25 <210> 33 <211> 118 <212> PRT <213> Mus musculus

ES 2 763 428 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Arg Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Asn Trp Glu Ile Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 <400> 33 115

<210> 34 <211> 111 <212> PRT <213> Mus musculus

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

5 <400> 34

<210> 35 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus

Arg Tyr Ser Val His
 <400> 35 1 5

10

<210> 36 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus

Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 <400> 36 1 5 10 15

15 <210> 37 <211> 10 <212> PRT <213> Mus musculus

Ser Asn Trp Glu Ile Tyr Ala Leu Asp Tyr
 <400> 37 1 5 10

<210> 38 <211> 15 <212> PRT <213> Mus musculus

20

Lys Ala Ser Gln Ser Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Asn Tyr Met Asn
 <400> 38 1 5 10 15

<210> 39 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

Val Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 <400> 39 1 5

25

<210> 40 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus

Gln Gln Ser Asn Val Glu Pro Tyr Thr
 <400> 40 1 5

30

ES 2 763 428 T3

<210> 41 <211> 354 <212> ADN <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..354 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc      60
acatgcactg tctctgggtt ctcattatcc agatatagta tacactgggt tcgccagcct      120
ccaagaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggtg gtggaagcac agactataat      180
tcagctctca aatccagact gagcatcaac aaggacaact ccaagaggca agttttctta      240
aaaatgcaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatctact actgtgccag atctaactgg      300
5 <400> 41 gagatctatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca      354

```

<210> 42 <211> 335 <212> ADN <213> Mus musculus

<220> <221> fuente <222> 1..335 <223> /mol_type="unassigned DNA" /organism="Mus musculus"

```

10 gacattgtgc tgaccaatc tccaccttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atctcctgca aggccagcca aagtattgat tatgatggtg atcgttatat gaactggtac      120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct      180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      240
<400> 42 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtcatga ggagccgcac      300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacg                                     335

```

<210> 43 <211> 118 <212> PRT <213> Mus musculus

```

15      Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
      1          5          10          15
      Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
      20          25          30
      Ser Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
      35          40          45
      Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
      50          55          60
      Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Arg Gln Val Phe Leu
      65          70          75          80
      Lys Met His Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
      85          90          95
      Arg Ser Asn Trp Glu Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100          105          110
      Ser Val Thr Val Ser Ser
<400> 43          115

```

<210> 44 <211> 111 <212> PRT <213> Mus musculus

ES 2 763 428 T3

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1          5          10          15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile Asp Tyr Asp
20          25          30
Gly Asp Arg Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35          40          45
Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65          70          75          80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85          90          95
Glu Glu Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105          110
<400> 44

```

<210> 45 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Arg Tyr Ser Ile His
5                    <400> 45 1                    5

```

<210> 46 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    --- --
                    Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
10          <400> 46 1                    5          10          15

```

<210> 47 <211> 10 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Ser Asn Trp Glu Ile Tyr Ala Met Asp Tyr
15          <400> 47 1                    5          10

```

<210> 48 <211> 15 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Lys Ala Ser Gln Ser Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Met Asn
20          <400> 48 1                    5          10          15

```

<210> 49 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
25          <400> 49 1                    5

```

<210> 50 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus

```

                    Gln Gln Ser His Glu Glu Pro His Thr
30          <400> 50 1                    5

```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para seleccionar un anticuerpo de unión a APRIL adecuado para detectar APRIL en el contexto de una muestra humana, que comprende:
- 5 - proporcionar una biblioteca de anticuerpos de unión a APRIL candidatos;
 - seleccionar anticuerpos de unión a APRIL de la biblioteca mediante selección por afinidad usando un péptido objetivo inmovilizado en un soporte sólido, comprendiendo dicho péptido objetivo una serie de epítomos de APRIL y una región de unión a receptor de APRIL de APRIL;
- 10 **caracterizado porque**, el péptido objetivo es APRIL humano, que está en interacción con un péptido, el péptido protector, que comprende una región de unión a APRIL de un receptor APRIL, en el que dicho receptor APRIL es BCMA o TACI.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biblioteca comprende una colección de linfocitos, preferentemente esplenocitos, recogidos de un mamífero, tal como un mamífero no humano, inmunizado con un agente adecuado para provocar una respuesta inmune específica de APRIL en el mamífero.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende además la determinación
- 20 de una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de unión a APRIL seleccionado y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de unión a APRIL seleccionado.
4. Péptido de unión a APRIL, que comprende dominios V_H y V_L de inmunoglobulina, que comprenden VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las
- 25 secuencias VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 8, 9, y 10 respectivamente, o
- VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 15, 16 y 17, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 18, 19, y 20 respectivamente, o
- 30 VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 28, 29, y 30 respectivamente, o
- VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 35, 36 y 37, respectivamente, y
- 35 VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 38, 39, y 40 respectivamente, o
- VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 45, 36 y 47, respectivamente, y VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 48, 49 y 50,
- 40 y que comprende un par de dominios V_H y V_L que tiene al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de similitud de secuencia con secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 3 y 4 o 24, o 13 y 14, o 33 y 34, o 43 y 44.
5. Célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de unión a APRIL según
- 45 la reivindicación 4.
6. Proceso para producir un péptido de unión a APRIL que comprende proporcionar células según la reivindicación 5, cultivar dichas células y permitir que las células expresen y preferentemente secreten el péptido de unión a APRIL.
- 50 7. Péptido de unión a APRIL según la reivindicación 4, **caracterizado porque** dicho péptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
8. Uso de un péptido de unión a APRIL según la reivindicación 4 en una prueba de diagnóstico, preferentemente una prueba de diagnóstico *ex vivo*, tal como una prueba destinada a diagnosticar una afección asociada con niveles de APRIL alterados, por ejemplo, una afección seleccionada de cánceres, afecciones asociadas con inflamación, sepsis, alergias, enfermedades autoinmunes o infecciones, tales como la bacteriemia.
- 55 9. Uso según la reivindicación 8, en el que en la prueba el péptido de unión a APRIL se detecta en una muestra de un sujeto y la presencia del péptido de unión a APRIL se usa como un indicador de la presencia de APRIL.
- 60

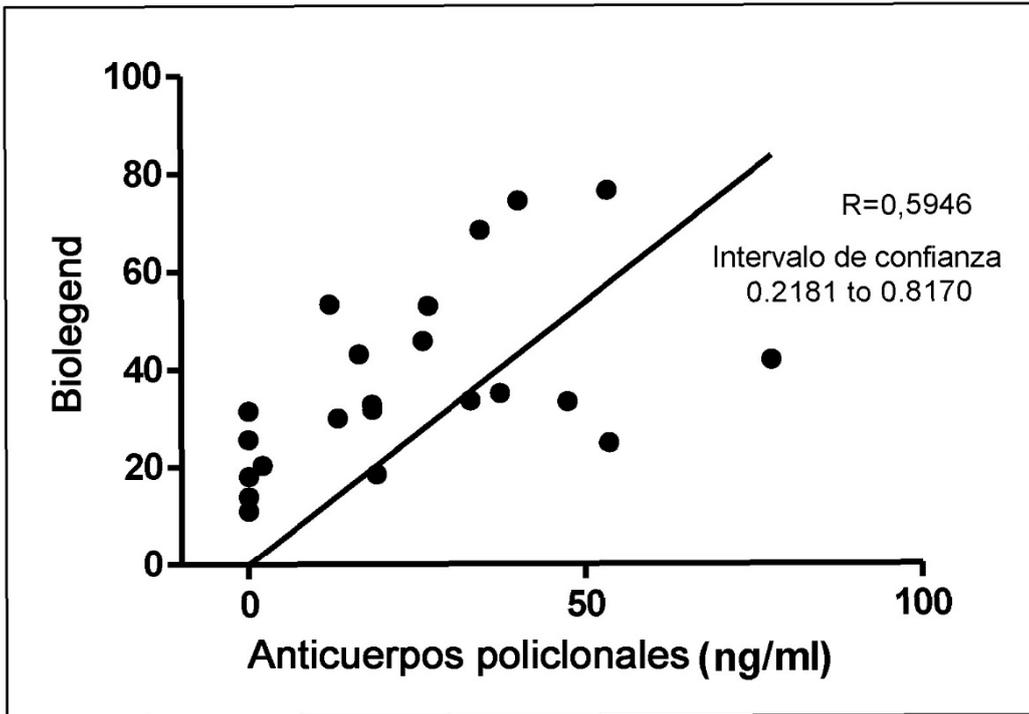


FIG. 1

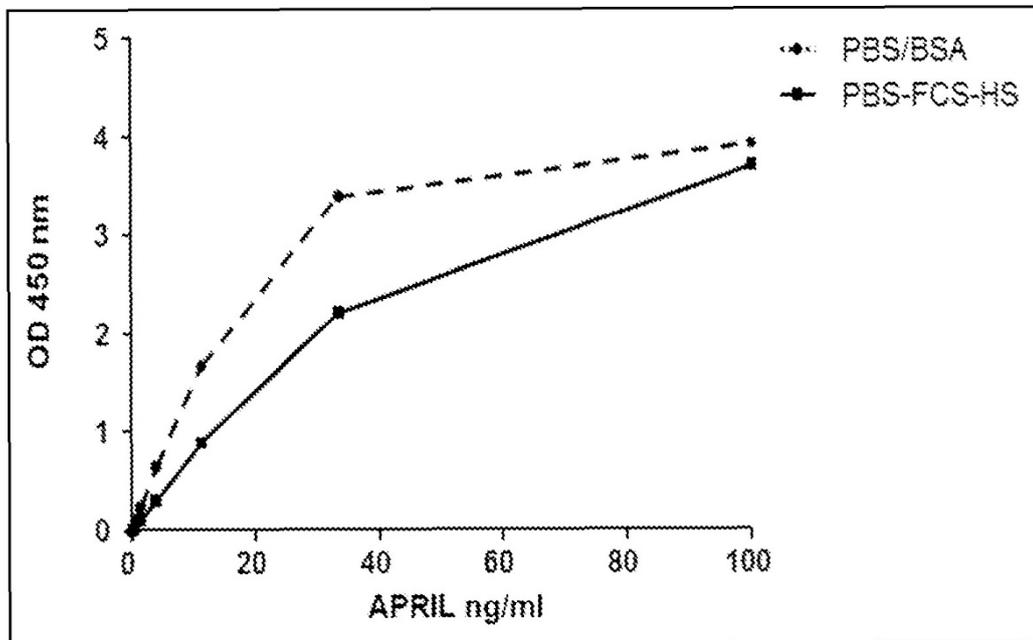


FIG. 2A

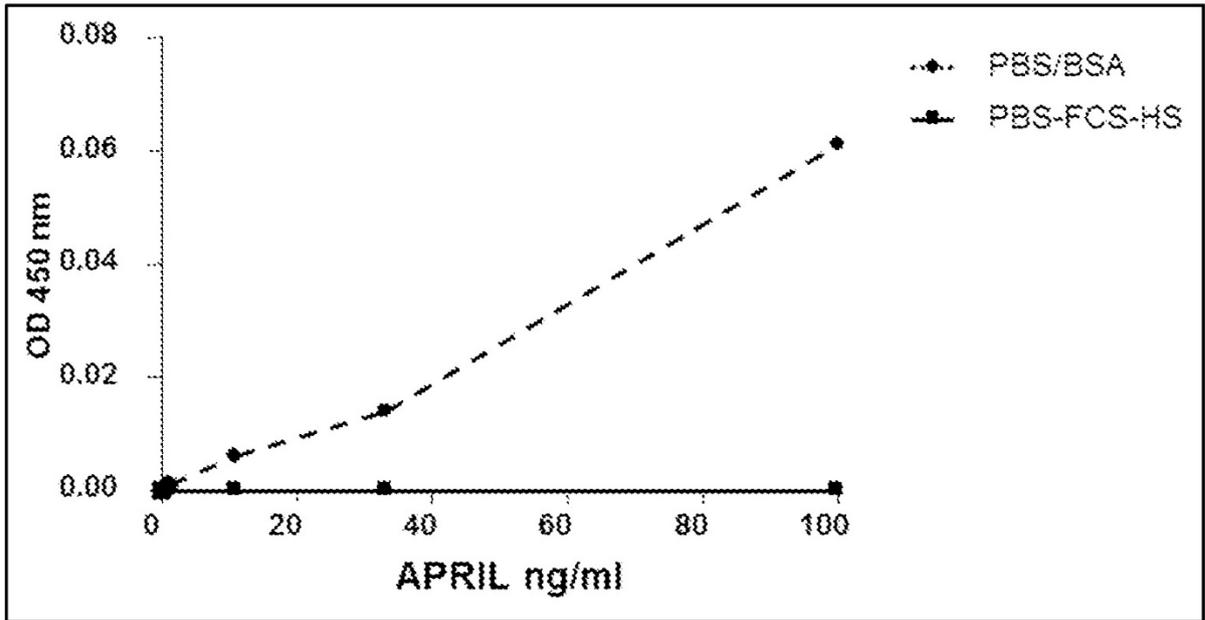


FIG. 2B

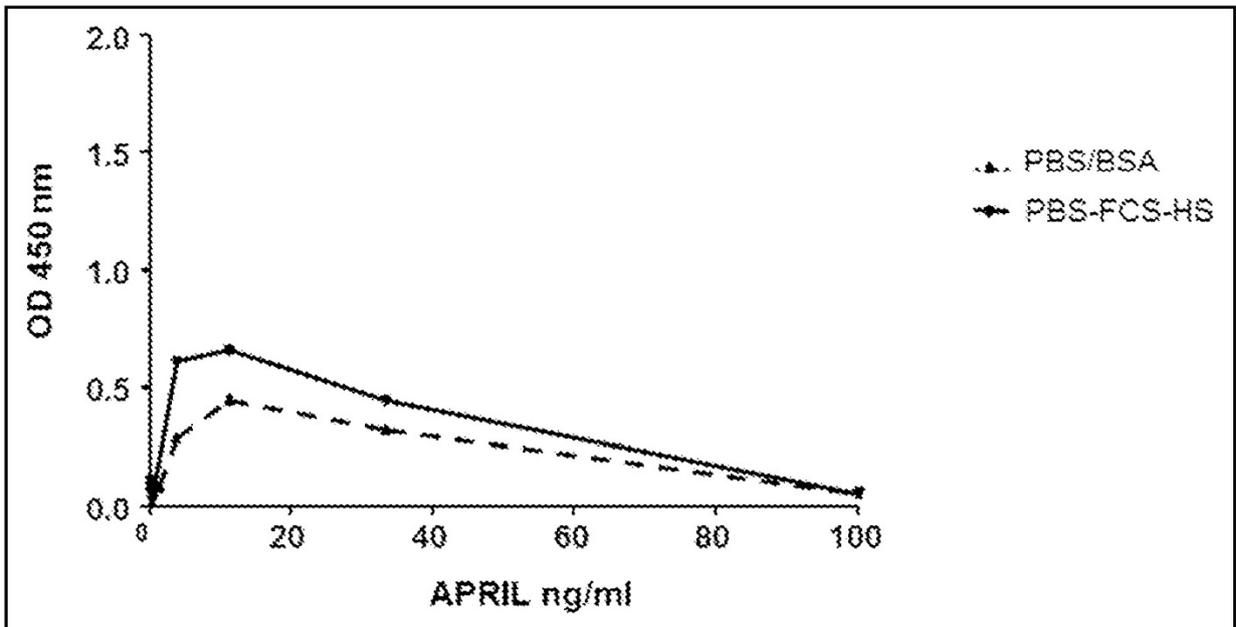


FIG. 2C

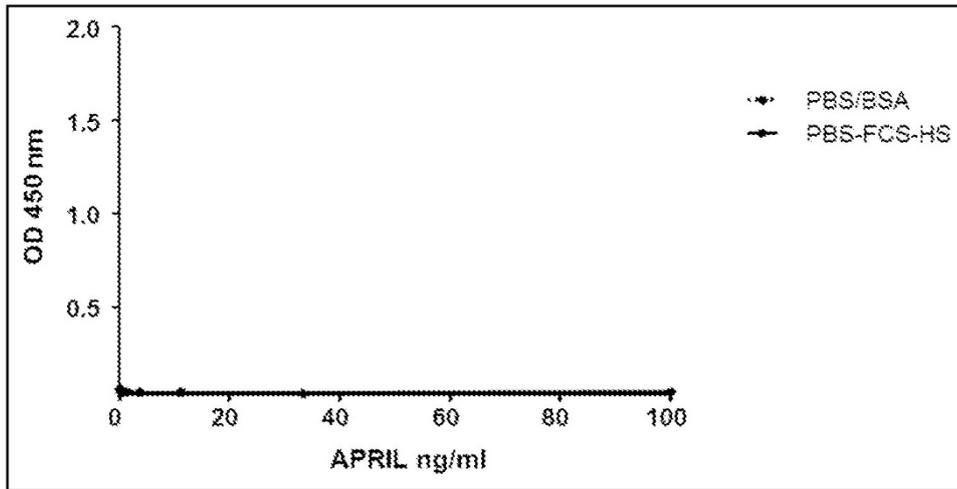


FIG. 2D

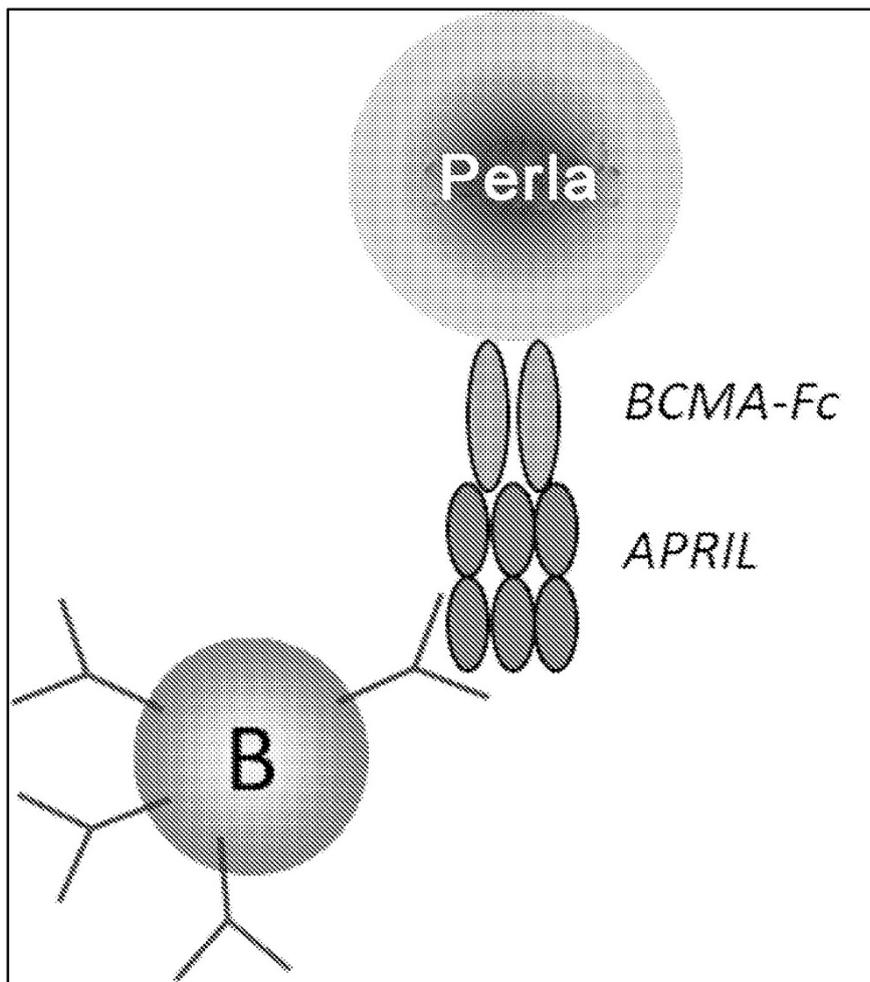


FIG. 3

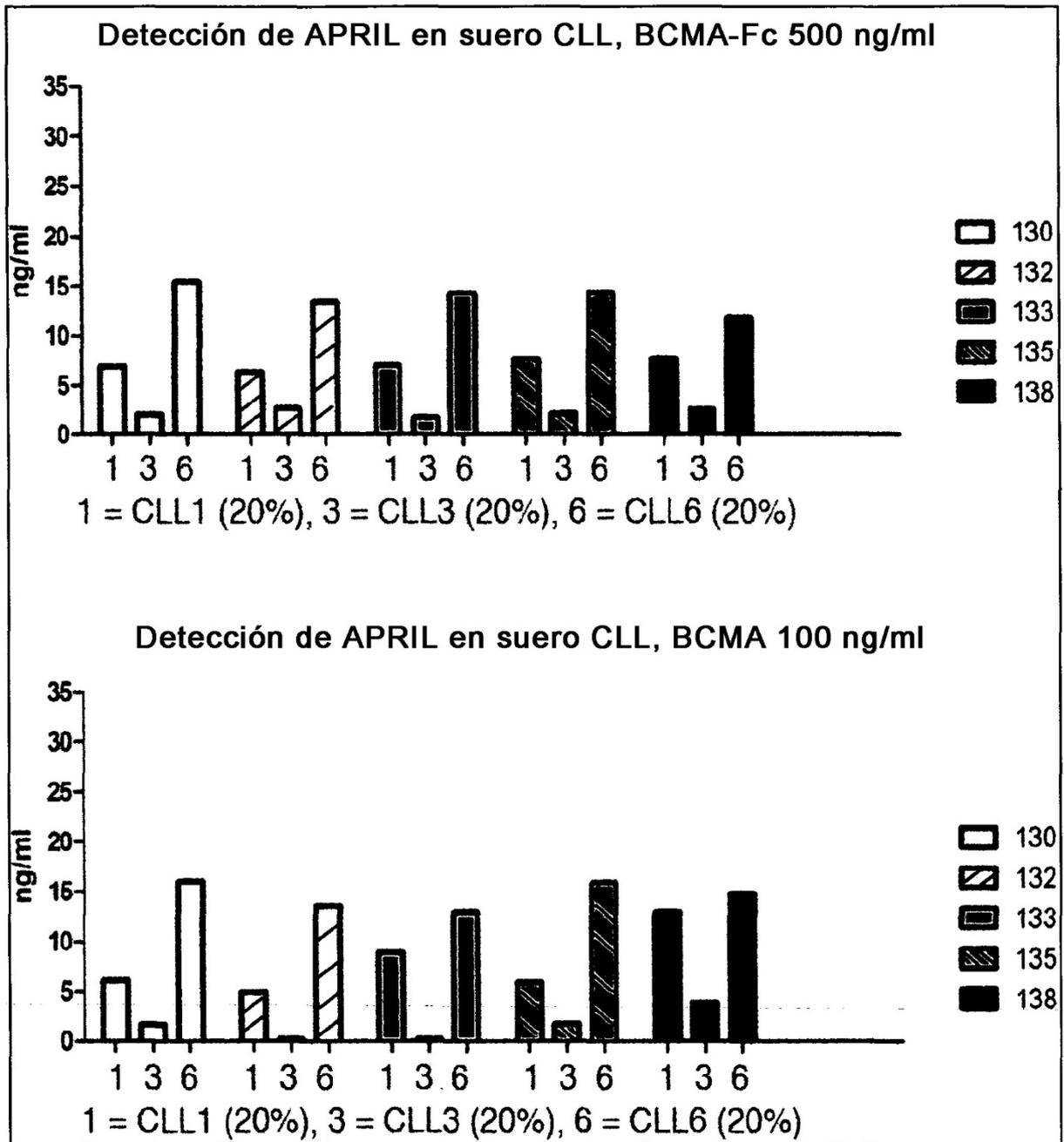


FIG. 4A

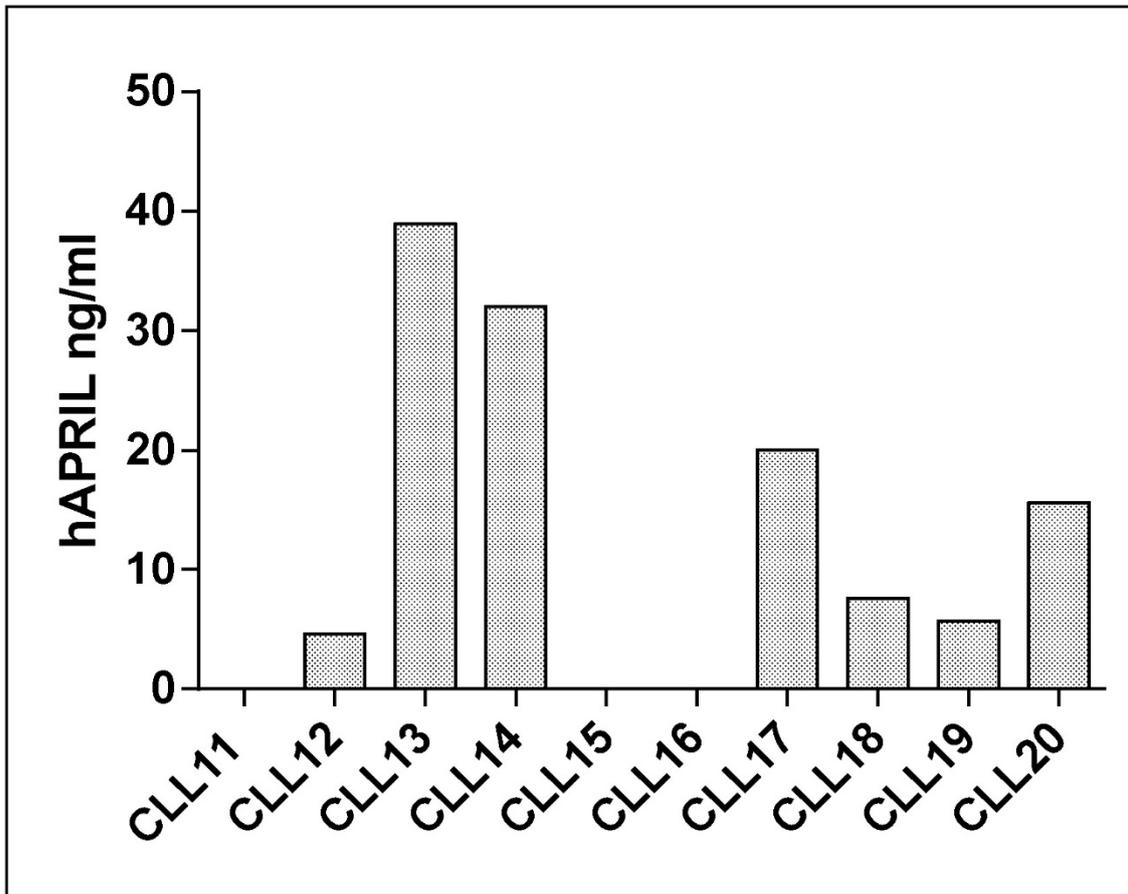


FIG. 4B

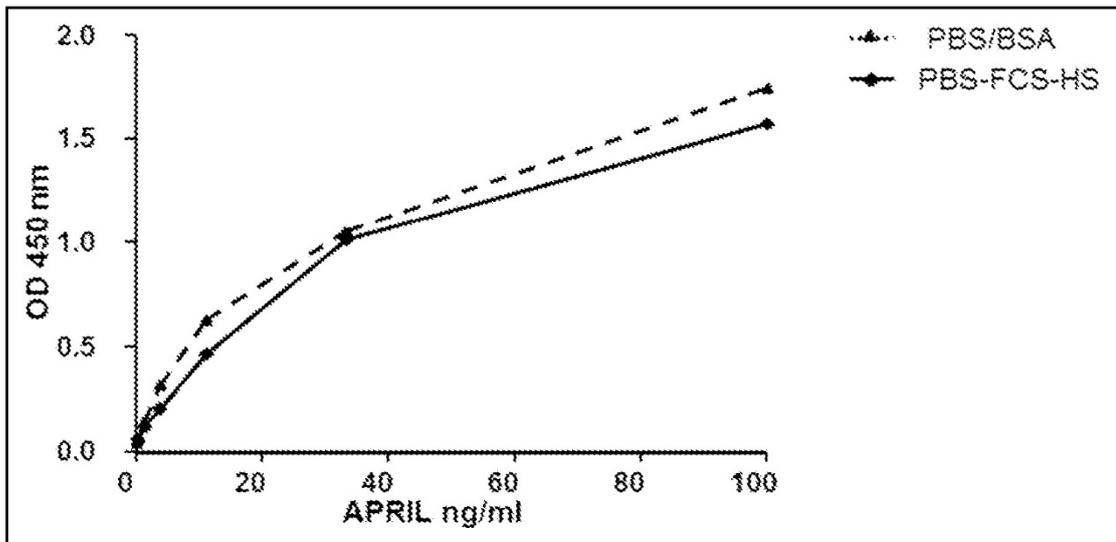


FIG. 5