



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

P.C.7

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

040/2060

54. TÍTULO

ACHICUERPOS HUMANOS ANTAGONISTAS
CONTRA Htnsf 13 b.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

CO7 K 16/00

71. SOLICITANTE

ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO

INDIANAPOLIS, INDIANA 46285 USA

74. APODERADO

CARLOS R. OLARTE

22. BOGOTÁ, D. C.,

Febrero 13, 2004

202099

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

04 012060 00

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒ X

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Indianapolis, Indiana 46285. Estados Unidos de America.

Nacionalidad o Domicilio:

Lugar de Constitución: Indianapolis, Estados Unidos de América.

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre C, Calle 100 No. 8A-55 Piso 10.

Teléfono: 6386200

Fax: 6386201

E-Mail: filings@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.782.747 Bta TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US02/21842

Publicación Internacional No. WO 03/016468

Fecha Agosto 15, 2002

Fecha Febrero 27, 2003

6

Título (54)

ANTICUERPOS HUMANOS ANTAGONISTAS CONTRA Htnsf 13b.

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/00

8

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Agosto 16, 2001

(31) Número de Solicitud

60/312,808

9

Comprobante de pago No. 10,172

Fecha Febrero 9, 2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: BUSQUEDA INTERNACIONAL

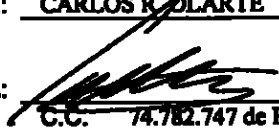
11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 74.782.747 de Btá T.P. 74.293

LISTA DE INVENTORES

Valentina Pavlovna GELFANOVA
6114 Lakeview Drive #172
Indianapolis, Indiana 46224
Estados Unidos de América
Nacionalidad: ESTADOUNIDENSE

John Edward HALE
7644 Forest Drive
Fishers, Indiana 46038
Estados Unidos de América
Nacionalidad: ESTADOUNIDENSE

Kristine Kay KIKLY
6458 North, 50 East
Fortville, Indiana 46040
Estados Unidos de América
Nacionalidad: ESTADOUNIDENSE

Derrick Ryan WITCHER
10898 Parrot Court
Fishers, Indiana 46038
Estados Unidos de América
Nacionalidad: ESTADOUNIDENSE

Radhakrishnan RATHNACHALAM
3793 Lattice Court
Carmel, Indiana 46032
India
Nacionalidad: India

4

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 04012060 00000000 Folios: 163
Fecha (AMD): 2004-02-13 09:29:00
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
~~Radicacion : 04012060 00000000 folios: 163
Fecha (AMD): 2004-02-13 09:29:00
Tramite : 011 PCT-PATENT 1 RESUMEN/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES~~

NTT : 000170007-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 10,172
FECHA : FEBRERO 7 DE 2004

***** COMISIONACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PASO	VR. PASO
FREDERICO TORRES	COMISIONACION	BANCO POPULAR	000-00110-6	13504210	07/02/2004	3,507,000.00

***** C O M D E S " T O *****

CANT. DEBITADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50000-01 01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

9
Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

ELI LILLY AND COMPANY

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Peter G. Stringer, Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.

Todd Rokita Secretario de Estado

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana 6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8. No. A2003- 11279
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

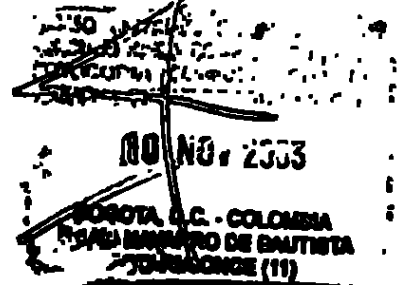
* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.

Marlen Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987



6
x
El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C

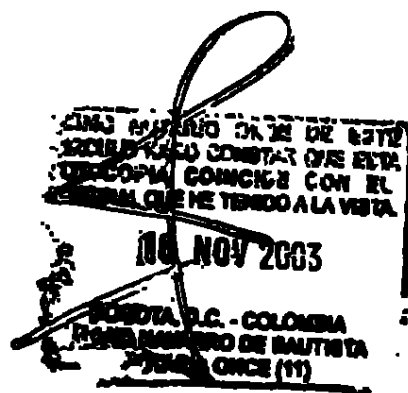
Marlen Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FREEM, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-85 Piso 10
BOGOTÁ, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

ELI LILLY AND COMPANY

El suscrito,

domiciliado en

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

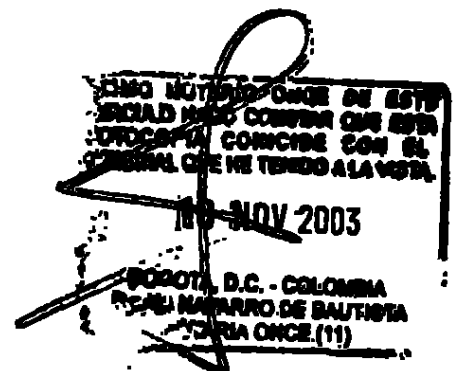
by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistirse y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma

Date/Fecha: 17 July 2003

City/Country/Ciudad,País: Indianapolis, Indiana, United States of America





Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

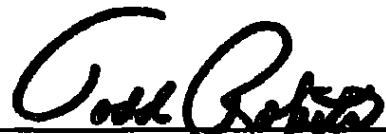
1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second* day of *July*, 2003
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2003- 11279
9. Seal/Stamp:

10. Signature:

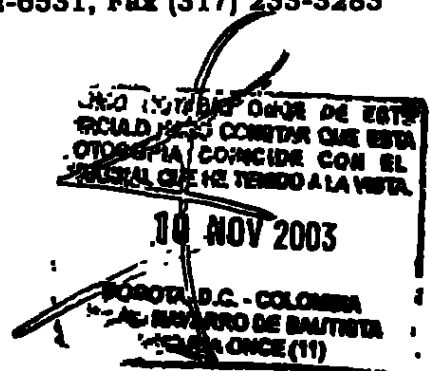



Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FREEM, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 838-8200
Fax: +57-1 838-8201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,

17 July 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana 46256 US
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Executive Director, International Patents** of **ELI LILLY AND COMPANY**

3. That **ELI LILLY AND COMPANY** having its principal place of business located in **Indianapolis, Indiana, United States of America**

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain Patent Matters, executed January 20, 2003; pursuant to the authority granted to the General Counsel of the Company by the executive Committee of the Board of Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado

Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

de

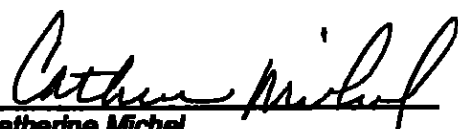
4. Que

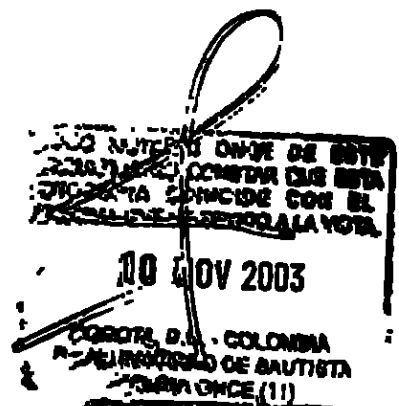
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):


Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016468 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/00, A61K 39/395

(21) International Application Number: PCT/US02/21842

(22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/312,808 16 August 2001 (16.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): GELFANOVA, Valentina, Pavlovna [BY/US]; 6114 Lakeview Drive #172, Indianapolis, IN 46224 (US). HALE, John, Edward [US/US]; 7644 Forest Drive, Fishers, IN 46038 (US). KIKLY, Kristine, Kay [US/US]; 6458 North, 50 East, Fortville, IN 46040 (US). WITCHER, Derrick, Ryan [US/US]; 10898 Parrot Court, Fishers, IN 46038 (US). RATHNACHALAM, Radhakrishnan [IN/US]; 3793 Lattice Court, Carmel, IN 46032 (US).

(74) Agents: COX, Gregory, A. et al.; Eli Lilly And Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GH, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 20 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTAGONISTIC ANTI-TNFSF13B HUMAN ANTIBODIES

(57) Abstract: Human monoclonal antibodies that specifically bind to TNFSF13b polypeptides are disclosed. These antibodies have high affinity for hTNFSF13b (e.g., $K_D = 10^{-8}$ M or less), a slow off rate for TNFSF13b dissociation (e.g., $K_{off} = 10^{-3}$ sec⁻¹ or less) and neutralize TNFSF13b activity in vitro and in vivo. The antibodies of the invention are useful in one embodiment for inhibiting TNFSF13b activity in a human subject suffering from a disorder in which hTNFSF13b activity is detrimental. Nucleic acids encoding the antibodies of the present invention, as well as, vectors and host cells for expressing them are also encompassed by the invention.

WO 03/016468 A3

11

ANTAGONISTIC ANTI-hTNFSF13b HUMAN ANTIBODIES

The TNF family ligands are known to be among the most pleiotropic cytokines, inducing a large number of cellular responses, including proliferation, cytotoxicity, anti-viral activity, immunoregulatory activities, and the transcriptional regulation of several genes. The TNF family of cytokines and receptors has undergone a large expansion in the last few years with the advent of massive EST sequencing. TNFSF13b is the official name adopted by the TNF Congress for BLyS, TALL-1, BAFF, THANK, neutrokin- α , and zTNF (for review see Locksley et al. Cell 2001 104:487). Human TNFSF13b (hTNFSF13b) is a 285-amino acid type II membrane-bound protein that possesses a N-terminal cleavage site that allows for the existence of both soluble and membrane bound proteins. Functionally, TNFSF13b appears to regulate B cell and some T cell immune responses.

Studies of septic shock syndrome and other disorders arising from overproduction of inflammatory cytokines have shown that an afflicted host will often counter high cytokine levels by releasing soluble cytokine receptors or by synthesizing high-affinity anti-cytokine antibodies. Methods of treatment that mimic such natural responses are considered as viable therapeutic approaches for alleviating cytokine-mediated disease. Thus, there is a well-recognized need for human antibodies that bind cytokines, such as TNFSF13b, that are involved in the regulation of cellular immune processes with high affinity and that have the capacity to antagonize the activity of the targeted cytokine *in vitro* and *in vivo*. Although international patent application WO00/50597 non-descriptively discloses antibodies directed at TNFSF13b, that application does not specifically describe the structural or functional characteristics of such antibodies.

The present invention provides anti-hTNFSF13b human antibodies, or antigen-binding portions thereof. The antibodies of the invention are characterized by high affinity binding to TNFSF13b polypeptides, slow dissociation kinetics, and the capacity to antagonize at least one *in vitro* and/or *in vivo* activity associated with TNFSF13b polypeptides.

The present invention also provides anti-hTNFSF13b human antibodies comprising a polypeptide selected from the group consisting of a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 4, a polypeptide as shown in SEQ

-2-

ID NO: 6, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 8, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 12, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 14, and a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 16.

In another embodiment, the invention provides an isolated anti-hTNFSF13b human antibody which binds to a hTNFSF13b polypeptide and dissociates from the hTNFSF13b polypeptide with a K_{off} rate constant of $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits TNFSF13b induced proliferation in an *in vitro* neutralization assay with an IC_{50} of $1 \times 10^{-8} M$ or less.

In an preferred embodiment, the invention provides an isolated anti-hTNFSF13b human antibody that has the following characteristics:

- a) inhibits TNFSF13b induced proliferation in an *in vitro* neutralization assay with an IC_{50} of $1 \times 10^{-8} M$ or less;
- b) has a heavy chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16; and
- c) has a light chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

The invention also provides methods of treating or preventing acute or chronic diseases or conditions associated with B cell and some T cell activity including, but not limited to, autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and/or neoplasia comprising the administration of an anti-hTNFSF13b human antibody of the present invention.

In another embodiment, the present invention provides sequences that encode the novel anti-hTNFSF13b human antibodies, vectors comprising the polynucleotide sequences encoding anti-hTNFSF13b human antibodies, host cells transformed with vectors incorporating polynucleotides that encode the anti-hTNFSF13b human antibodies, formulations comprising anti-hTNFSF13b human antibodies and methods of making and using the same.

In another embodiment, the present invention provides the epitope of the antigen to which the novel anti-hTNFSF13b human antibodies bind. Thus, the invention also provides a use of an antibody that binds the epitope of the present invention thereby neutralizing the TNFSF13b activity for the treatment or prevention of acute or chronic diseases or conditions associated with B cell and some T cell activity including, but not

-3-

limited to, autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and/or neoplasia.

The invention also encompasses an article of manufacture comprising a packaging material and an antibody contained within said packaging material, wherein the antibody neutralizes TNFSF13b activity for treatment or prevention of a human subject suffering from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental, and wherein the packaging material comprises a package insert which indicates that the antibody neutralizes by binding an epitope of TNFSF13b, wherein the epitope comprises lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, and glutamic acid at position 105; and a package insert that provides for administration of the dosage form that results in neutralizing TNFSF13b activity.

Fig. 1. Graph illustrating the inhibition of hTNFSF13b and IL-1 induced proliferation of T1165.17 cells by human antibody 4A5-3.1.1-B4.

Fig. 2. Graph illustrating the neutralization of hTNFSF13b induced proliferation by human antibody 4A5-3.1.1-B4 in primary human B cells stimulated with anti-IgM.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined.

An antibody is an immunoglobulin molecule comprised of four polypeptide chains, two heavy (H) chains (about 50-70 kDa) and two light (L) chains (about 25 kDa) inter-connected by disulfide bonds. Light chains are classified as kappa and lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, respectively. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2, and CH3 for IgG, IgD and IgA, and 4 domains, CH1, CH2, CH3, CH4 for IgM and IgE. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The HCVR and LCVR regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDRs), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each HCVR and LCVR is composed of three CDRs and four FRs. arranged from amino-

terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with well known conventions. [Kabat, *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242
5 (1991); Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989)]. The functional characteristics of the antibody to bind a particular antigen are determined by the CDRs.

In the present disclosure the term "antibody" is intended to refer to a monoclonal antibody *per se*. A monoclonal antibody can be a human antibody, chimeric antibody,
10 humanized antibody, Fab fragment, Fab' fragment, F(ab')₂, or single chain FV fragment. Preferably the term "antibody" refers to human antibody.

The term "human antibody" includes antibodies having variable and constant regions corresponding to human germline immunoglobulin sequences. Human antibodies have several advantages over non-human and chimeric antibodies for use in human
15 therapy. For example, the effector portion of a human antibody may interact better with the other parts of the human immune system (e.g., destroy the target cells more efficiently by complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)). Another advantage is that the human immune system should not recognize the human antibody as foreign, and, therefore the antibody response against such an injected
20 antibody should be less than against a totally foreign non-human antibody or a partially foreign chimeric antibody. In addition, injected non-human antibodies have been reported to have a half-life in the human circulation much shorter than the half-life of human antibodies. Injected human antibodies will have a half-life essentially identical to naturally occurring human antibodies, allowing smaller and less frequent doses to be
25 given.

The term "hTNFSF13b" refers to the human form of a member of the tumor necrosis factor family of ligands described in international patent applications WO98/18921 and WO00/50597 (referred to therein as neutrokin- α). The term
"TNFSF13b" is intended to encompass hTNFSF13b as well as homologs of hTNFSF13b
30 derived from other species. The terms "hTNFSF13b" and "TNFSF13b" are intended to include forms thereof, which can be prepared by standard recombinant expression

-5-

methods or purchased commercially (Research Diagnostics Inc. Catalog No. RDI-3113, rhuBAFF, Flanders, N.J.) as well as generated synthetically.

The phrase "biological property", "biological characteristic", and the term "activity" in reference to an antibody of the present invention are used interchangeably
5 herein and include, but are not limited to, epitope affinity and specificity (e.g., anti-hTNFSF13b human antibody binding to hTNFSF13b), ability to antagonize the activity of the targeted polypeptide (e.g., TNFSF13b activity), the *in vivo* stability of the antibody, and the immunogenic properties of the antibody. Other identifiable biological properties or characteristics of an antibody recognized in the art include, for example, cross-
10 reactivity, (i.e., with non-human homologs of the targeted polypeptide, or with other proteins or tissues, generally), and ability to preserve high expression levels of protein in mammalian cells. The aforementioned properties or characteristics can be observed or measured using art-recognized techniques including, but not limited to ELISA, competitive ELISA, surface plasmon resonance analysis, *in vitro* and *in vivo*
15 neutralization assays (e.g., Example 2), and immunohistochemistry with tissue sections from different sources including human, primate, or any other source as the need may be. Particular activities and biological properties of anti-hTNFSF13b human antibodies are described in further detail in the Examples below.

The phrase "contact position" includes an amino acid position in the CDR1, CDR2 or CDR3 of the heavy chain variable region or the light chain variable region of an
20 antibody which is occupied by an amino acid that contacts antigen. If a CDR amino acid contacts the antigen, then that amino acid can be considered to occupy a contact position.

"Conservative substitution" or "conservative amino acid substitution" refers to amino acid substitutions, either from natural mutations or human manipulation, wherein
25 the antibodies produced by such substitutions have substantially the same (or improved or reduced, as may be desirable) activity(ies) as the antibodies disclosed herein.

The term "epitope" as used herein refers to a region of a protein molecule to which an antibody can bind. An "immunogenic epitope" is defined as the part of a protein that elicits an antibody response when the whole protein is the immunogen.

30 The term "binds" as used herein, generally refers to the interaction of the antibody to the epitope of the antigen. More specifically, the term "binds" relates to the affinity of the antibody to the epitope of the antigen. Affinity is measured by K_D .

-6-

The term "inhibit" or "inhibiting" includes the generally accepted meaning, which includes neutralizing, prohibiting, preventing, restraining, slowing, stopping, or reversing progression or severity of a disease or condition.

The term "neutralizing" or "antagonizing" in reference to an anti-TNFSF13b antibody or the phrase "antibody that antagonizes TNFSF13b activity" is intended to refer to an antibody or antibody fragment whose binding to TNFSF13b results in inhibition of a biological activity induced by TNFSF13b polypeptides. Inhibition of TNFSF13b biological activity can be assessed by measuring one or more *in vitro* or *in vivo* indicators of TNFSF13b biological activity including, but not limited to, TNFSF13b-induced proliferation, TNFSF13b-induced immunoglobulin secretion, TNFSF13b-induced prevention of B cell apoptosis, or inhibition of receptor binding in a TNFSF13b receptor binding assay. Indicators of TNFSF13b biological activity can be assessed by one or more of the several *in vitro* or *in vivo* assays known in the art. (see, for example, Moore, P.A., et al., Science, 285:260-263 (1999); Schneider, P., et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Shu, H., et al., J. Leuko. Biol., 65:680-683 (1999); Mukhopadhyay, A., et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999); Mackay, F. et al., J. Exp. Med., 190:1697-1710 (1999); Gross, J.A., et al., Nature, 404:995-999 (2000); and Example 2). Preferably, the ability of an antibody to neutralize or antagonize TNFSF13b activity is assessed by inhibition of B cell proliferation as shown in Example 2.

The term " K_{off} ", as used herein, is intended to refer to the off rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " K_D ", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant or the "off" rate divided by the "on" rate, of a particular antibody-antigen interaction. For purposes of the present invention K_D was determined as shown in Example 4

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. Ordinarily, an isolated antibody is prepared by at least one purification step. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, and (2) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or

-7-

nonreducing conditions using Coomassie blue, or preferably, silver stain. Preferably, an "isolated antibody" is an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds hTNFSF13b substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than hTNFSF13b polypeptide).

The phrase "nucleic acid molecule" includes DNA molecules and RNA molecules. A nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

The phrase "isolated nucleic acid molecule", as used herein in reference to nucleic acids encoding antibodies or antibody fragments (e.g., HCVR, LCVR, CDR3) that bind hTNFSF13b polypeptide, includes a nucleic acid molecule in which the nucleotide sequences encoding the antibody, or antibody portion, are free of other nucleotide sequences encoding antibodies or antibody fragments that bind antigens other than hTNFSF13b polypeptide, which other sequences may naturally flank the nucleic acid in human genomic DNA. Thus, for example, an isolated nucleic acid of the invention encoding a HCVR region of an anti-hTNFSF13b human antibody contains no other sequences encoding HCVR regions that bind antigens other than hTNFSF13b polypeptide.

The term "vector" includes a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the

-8-

most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses), that serve equivalent functions.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading frame. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "recombinant" in reference to an antibody includes antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means. Representative examples include antibodies expressed using a recombinant expression vector transfected into a host cell, antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes or antibodies prepared, expressed, created or isolated by any means that involves splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences.

The phrase "recombinant host cell" (or simply "host cell") includes a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

Recombinant human antibodies may also be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis)

and, thus, the amino acid sequences of the HCVR and LCVR regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from those related to human germline HCVR and LCVR sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

5 Transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production can be employed. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge (see, e.g., Jakobovits, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-10 2555, (1993); Jakobovits, *et al.*, *Nature*, 362:255-258, (1993); Bruggemann, *et al.*, *Year in Immun.*, 7:33 (1993); *Nature* 148:1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Gross, J.A., *et al.*, *Nature*, 404:995-999 (2000); and U.S. patents nos. 5,877,397, 5,874,299, 5,814,318, 5,789,650, 5,770,429, 5,661,016, 5,633,425, 5,625,126, 5,569,825, and 5,545,806 (each of which is incorporated herein by reference in its entirety for all 15 purposes)). Human antibodies can also be produced in phage display libraries (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1992); Marks, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). The techniques of Cole *et al.* and Boerner, *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole, *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therap*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner, *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 20 (1991)).

"Container" means any receptacle and closure suitable for storing, shipping, dispensing, and/or handling a pharmaceutical product.

"Packaging material" means a customer-friendly device allowing convenient administration and/or ancillary devices that aid in delivery, education, and/or 25 administration. The packaging material may improve antibody administration to the patient, reduce or improve educational instruction time for the patient, provide a platform for improved health economic studies, and/or limit distribution channel workload. Also, the packaging material may include but not be limited to a paper-based package, shrink wrapped package, see-through top packaging, trial-use coupons, educational materials, 30 ancillary supplies, and/or delivery device.

"Package insert" means information accompanying the product that provides a description of how to administer the product, along with the safety and efficacy data

20

-10-

required to allow the physician, pharmacist, and patient to make an informed decision regarding use of the product, and/or patient education information. The package insert generally is regarded as the "label" for a pharmaceutical product.

A "subject" means a mammal; preferably a human in need of a treatment. In regards to the present invention subjects in need of treatment include mammals that are suffering from, or are prone to suffer from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental, for example immune diseases, including autoimmune diseases, and inflammatory diseases. Preferred disorders include, but are not limited to, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, asthma, allergic diseases, psoriasis, graft versus host disease, organ transplant rejection, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, sarcoidosis, infectious diseases, parasitic diseases, female infertility, autoimmune thrombocytopenia, autoimmune thyroid disease, Hashimoto's disease, Sjogren's syndrome, and cancers, particularly B or T cell lymphomas or myelomas.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

The present invention relates to human monoclonal antibodies that are specific for and neutralize bioactive hTNFSF13b polypeptides. Also disclosed are antibody heavy and light chain amino acid sequences which are highly specific for and neutralize TNFSF13b polypeptides when they are bound to them. This high specificity enables the anti-hTNFSF13b human antibodies, and human monoclonal antibodies with like specificity, to be immunotherapy of TNFSF13b associated diseases.

In one aspect, the invention provides an isolated human antibody comprising at least one of the amino acid sequences shown in SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16 and that binds a TNFSF13b polypeptide epitope with high affinity, dissociates from a bound TNFSF13b polypeptide with a low K_{off} rate constant of $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ or less, and has the capacity to antagonize TNFSF13b polypeptide activity. In one embodiment, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises a polypeptide selected from the group consisting of: CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as

shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises at least two of the polypeptides selected from the group

5 consisting of: CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the anti-hTNFSF13b

10 human antibody comprises at least three of the polypeptides selected from the group consisting of: CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of

15 the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises at least four of the polypeptides selected from the group consisting of: CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of

20 the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises at least five of the polypeptides selected from the group consisting of: CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of

25 the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises the polypeptides of CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4; CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6; CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12; CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16.

30

More preferred, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises a light chain variable region (LCVR) polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 or a heavy chain variable region (HCVR) polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10. Even more preferred, the anti-hTNFSF13b human antibody comprises the LCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 and the HCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10.

In preferred embodiments, the isolated human antibody dissociates from a bound TNFSF13b polypeptide with a K_{off} rate constant of $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ or less, and inhibits TNFSF13b induced proliferation in an *in vitro* neutralization assay with an IC_{50} of $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ or less. In more preferred embodiments, the isolated human antibody dissociates from a bound TNFSF13b polypeptide epitope with a K_{off} rate constant of $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ or less and inhibits TNFSF13b induced proliferation in an *in vitro* neutralization assay with an IC_{50} of $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ or less. In an even more preferred embodiment, the isolated anti-TNFSF13b human antibody dissociates from a bound hTNFSF13b polypeptide with a K_{off} rate constant of $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ or less and inhibits TNFSF13b induced proliferation in an *in vitro* assay with an IC_{50} of $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ or less. Examples of anti-hTNFSF13b human antibodies that meet, the aforementioned kinetic and neutralization criteria include 4A5-3.1.1-B4 antibodies.

The most preferred anti-hTNFSF13b human antibody of the present invention is referred to herein as 4A5-3.1.1-B4. 4A5-3.1.1-B4 has LCVR and HCVR polypeptide sequences as shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:10, respectively. The polynucleotide sequence encoding the LCVR and HCVR of 4A5-3.1.1-B4 is shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:9, respectively. The properties of the anti-hTNFSF13b human antibodies of the present invention are specifically disclosed in the Examples. Particularly notable is the high affinity for TNFSF13b polypeptide, slow dissociation kinetics, and high capacity to antagonize TNFSF13b polypeptide activity demonstrated by 4A5-3.1.1-B4.

The K_{off} of an anti-hTNFSF13b human antibody can be determined by surface plasmon resonance as generally described in Example 4. Generally, surface plasmon resonance analysis measures real-time binding interactions between ligand (recombinant TNFSF13b polypeptide immobilized on a biosensor matrix) and analyte (antibodies in solution) by surface plasmon resonance (SPR) using the BIAcore system (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). SPR analysis can also be performed by immobilizing the

-13-

analyte (antibodies on a biosensor matrix) and presenting the ligand (recombinant TNFSF13b in solution).

In one aspect, the present invention is also directed to the cell lines which produce the anti-hTNFSF13b human antibodies of the present invention. The isolation of cell
5 lines producing monoclonal antibodies of the invention can be accomplished using routine screening techniques known in the art. A hybridoma which produces an anti-hTNFSF13b human antibody of the present invention has been deposited with ATCC, (ATCC PTA-3674) as disclosed herein.

A wide variety of host expression systems can be used to express the antibodies of
10 the present invention including bacterial, yeast, baculoviral, plant, and mammalian expression systems (as well as phage display expression systems). An example of a suitable bacterial expression vector is pUC119 (Sfi). Other antibody expression systems are also known in the art and are contemplated herein.

An antibody of the invention can be prepared by recombinant expression of
15 immunoglobulin light and heavy chain genes in a host cell. To express an antibody recombinantly, a host cell is transfected with one or more recombinant expression vectors carrying DNA fragments encoding the immunoglobulin light and heavy chains of the antibody such that the light and heavy chains are expressed in the host cell. Preferably, the recombinant antibodies are secreted into the medium in which the host cells are
20 cultured, from which medium the antibodies can be recovered. Standard recombinant DNA methodologies are used to obtain antibody heavy and light chain genes, incorporate these genes into recombinant expression vectors, and introduce the vectors into host cells.

The isolated DNA encoding the HCVR region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the HCVR-encoding DNA to another DNA
25 molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2, and CH3). The DNA sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region and any allotypic variant therein as described in Kabat, (Kabat, *et al.*,
30 *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), but most preferably is an IgG1, or IgG4 constant region. Alternatively, the antibody portion can be an Fab

24

-14-

fragment, a Fab' fragment, F(ab')₂, or a single chain FV fragment. For a Fab fragment heavy chain gene, the HCVR-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The isolated DNA encoding the LCVR region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the LCVR-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The DNA sequences of human light chain constant region genes are known in the art and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region.

To create a scFV gene, the HCVR- and LCVR-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser- Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (Gly₄-Ser)₃, such that the HCVR and LCVR sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the LCVR and HCVR regions joined by the flexible linker (see e.g., Bird *et al. Science* 242:423-426 (1988); Huston, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty, *et al., Nature* 348:552-554 (1990)).

To express the antibodies of the invention, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, obtained as described above, are inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. The antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). Additionally, or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the anti-hTNFSF13b human antibody chain from a host cell. The anti-hTNFSF13b human antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The

-15-

signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (i.e., a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. Regulatory sequences comprise promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)) and polyoma.

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced. For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin, or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr-host cells with methotrexate selection/amplification) and the *neo* gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, e.g., electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because

-16-

such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody.

Preferred mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr-CHO cells, described in Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216-4220 (1980), used with a DHFR selectable marker, e.g., as described in R.J. Kaufman and P.A. Sharp, *Mol. Biol.*, 159:601-621 (1982)), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Host cells can also be used to produce portions of intact antibodies, such as Fab fragments of scFV molecules. It will be understood that variations on the above procedure are within the scope of the present invention. For example, it may be desirable to transfect a host cell with DNA encoding either the light chain or the heavy chain (but not both) of an antibody of this invention. Recombinant DNA technology may also be used to remove some or all of the DNA encoding either or both of the light and heavy chains that is not necessary for binding to hTNFSF13b. The molecules expressed from such truncated DNA molecules are also encompassed by the antibodies of the invention. In a one system for recombinant expression of an antibody of the invention, a recombinant expression vector encoding both the antibody heavy chain and the antibody light chain is introduced into dhfr-CHO cells by calcium phosphate-mediated transfection. Within the recombinant expression vector, the antibody heavy and light chain genes are each operatively linked to enhancer/promoter regulatory elements (e.g., derived from SV40, CMV, adenovirus and the like, such as a CMV enhancer/AdMLP promoter regulatory element or an SV40 enhancer/AdMLP promoter regulatory element) to drive high levels of transcription of the genes. The recombinant expression vector also carries a DHFR gene, which allows for selection of CHO cells that have been transfected with the vector using methotrexate selection/amplification. The selected transformant host cells are culture to allow for expression of the antibody heavy and light chains and intact antibody

27
28

-17-

is recovered from the culture medium. Standard molecular biology techniques are used to prepare the recombinant expression vector, transfect the host cells, select for transformants, culture the host cells and recover the antibody from the culture medium. Antibodies or antigen-binding portions thereof of the invention can be expressed in an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes (see e.g., Taylor, L.D., *et al.* Nucl. Acids Res., 20:6287-6295(1992)). Plant cells can also be modified to create transgenic plants that express the antibody or antigen binding portion thereof, of the invention.

In view of the foregoing, another aspect of the invention pertains to nucleic acids, vectors, and host cell compositions that can be used for recombinant expression of the antibodies and antibody portions of the invention. Preferably, the invention features isolated nucleic acids that encode CDRs of 4A5-3.1.1-B4, or the full heavy and/or light chain variable region of 4A5-3.1.1-B4. Accordingly, in one embodiment, the invention features an isolated nucleic acid encoding an antibody heavy chain variable region that encodes the 4A5-3.1.1-B4 heavy chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16. Preferably, the nucleic acid encoding the antibody heavy chain variable region further encodes a 4A5-3.1.1-B4 heavy chain CDR2 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:14. More preferably, the nucleic acid encoding the antibody heavy chain variable region further encodes a 4A5-3.1.1-B4 heavy chain CDR1 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:12. Even more preferably, the isolated nucleic acid encodes an antibody heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:10 (the full HCVR region of 4A5-3.1.1-B4).

In other embodiments, the invention features an isolated nucleic acid encoding an antibody light chain variable region that encodes the 4A5-3.1.1-B4 light chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8. Preferably, the nucleic acid encoding the antibody light chain variable region further encodes a 4A5-3.1.1-B4 light chain CDR1 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4. Even more preferably, the isolated nucleic acid encodes an antibody light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 (the full LCVR region of 4A5-3.1.1-B4).

In other embodiments, the invention features an isolated nucleic acid encoding an antibody light chain variable region that encodes the 4A5-3.1.1-B4 light chain CDR3

28

-18-

comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8. Preferably, the nucleic acid encoding the antibody light chain variable region further encodes a 4A5-3.1.1-B4 light chain CDR1 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4. Even more preferably, the isolated nucleic acid encodes an antibody light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 (the full LCVR region of 4A5-3.1.1-B4).

In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid encoding a heavy chain CDR3 domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 (i.e., the 4A5-3.1.1-B4 HCVR CDR3). This nucleic acid can encode only the CDR3 region or, more preferably, encodes an entire antibody heavy chain variable region (HCVR). For example, the nucleic acid can encode a HCVR having a CDR2 domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:14 (i.e., the 4A5-3.1.1-B4 HCVR CDR2) and a CDR1 domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:12 (i.e., 4A5-3.1.1-B4 HCVR CDR1).

In still another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid encoding an antibody light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 (i.e., the 4A5-3.1.1-B4 LCVR). Preferably this nucleic acid comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, although the skilled artisan will appreciate that due to the degeneracy of the genetic code, other nucleotide sequences can encode the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. The nucleic acid can encode only the LCVR or can also encode an antibody light chain constant region, operatively linked to the LCVR. In one embodiment, this nucleic acid is in a recombinant expression vector.

In still another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid encoding an antibody heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:10 (i.e., the 4A5-3.1.1-B4 HCVR). Preferably this nucleic acid comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO:9, although the skilled artisan will appreciate that due to the degeneracy of the genetic code, other nucleotide sequences can encode the amino acid sequence of SEQ ID NO:10. The nucleic acid can encode only the HCVR or can also encode a heavy chain constant region, operatively linked to the HCVR. For example, the nucleic acid can comprise an IgG1 or IgG4 constant region. In one embodiment, this nucleic acid is in a recombinant expression vector.

29

Those of ordinary skill in the art are aware that modifications in the amino acid sequence of the antibody can result in an antibody that display equivalent or superior functional characteristics when compared to the original antibody. Alterations in the antibodies of the present invention can include one or more amino acid insertions, deletions, substitutions, truncations, fusions, and the like, either from natural mutations or human manipulation. The present invention encompasses antibodies disclosed herein further comprising one or more amino acid substitutions provided that the substituted antibodies have substantially the same (or improved or reduced, as may be desirable) activity(ies) as the antibodies disclosed herein. Preferably, a CDR of the present invention has 3 or less conservative substitutions. Preferably, a CDR of the present invention has 2 or less conservative substitutions. Preferably, a CDR of the present invention has one conservative substitution. The skilled artisan will recognize that antibodies having conservative amino acid substitutions can be prepared by a variety of techniques known in the art. For example, a number of mutagenesis methods can be used, including PCR assembly, Kunkel (dut-ung-) and thiophosphate (Amersham Sculptor kit) oligonucleotide-directed mutagenesis. Conservative substitutions of interest are shown in Table 1 along with preferred substitutions.

Table 1. Conservative Substitutions

Residue	Substitutions	Preferred Substitution
Ala (A)	gly, val, leu, ile, ser, met, thr	Val
Arg (R)	lys, gln, asn, his	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Ala, ile, leu, pro, ser, met, val, val	Ala
His (H)	Asn, gln, lys, arg	Arg
Ile (I)	Leu, val, met, ala, phe, norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala, phe	Ile
Lys (K)	Arg, gln, asn, his	Arg
Met (M)	Ala, gly, ile, leu, phe, ser, val	Leu
Phe (F)	Leu, val, ile, ala, trp, tyr	Tyr
Pro (P)		
Ser (S)	Ala, gly, ile, leu, met, thr, val	Thr
Thr (T)	Ala, gly, ile, leu, met, ser, val	Ser
Trp (W)	tyr, phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	Phe
Val (V)	Ala, ile, leu, met, ser, met, norleu	Leu

30

-20-

The invention also provides recombinant expression vectors encoding an antibody comprising a polypeptide selected from the group consisting of a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 4, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 6, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 8, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 12, a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 14; and a polypeptide as shown in SEQ ID NO: 16.

The invention also provides recombinant expression vectors encoding both an antibody heavy chain and an antibody light chain. For example, in one embodiment, the invention provides a recombinant expression vector encoding:

- 10 a) an antibody heavy chain having a variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:10; and
- b) an antibody light chain having a variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, ion exchange, affinity, reverse phase, hydrophobic interaction column chromatography, gel electro-phoresis and the like. Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically or prophylactically, as directed herein.

The antibodies of the present invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. Typically, the pharmaceutical composition comprises an antibody or antibody portion of the invention and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, and/or excipient. The pharmaceutical compositions for administration are designed to be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable diluents, carrier, and/or excipients such as dispersing agents, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing agents and the like are used as appropriate.

30 A pharmaceutical composition comprising an anti-hTNFSF13b human antibody of the present invention can be administered to a mammal at risk for or exhibiting autoimmunity related symptoms or pathology such as systemic lupus erythematosus using

31

-21-

standard administration techniques by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, pulmonary, transdermal, intramuscular, intranasal, buccal, sublingual, or suppository administration.

The antibodies of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for parenteral administration. Peripheral systemic delivery by intravenous or intraperitoneal or subcutaneous injection is preferred. Suitable vehicles for such injections are straightforward. In addition, however, administration may also be effected through the mucosal membranes by means of nasal aerosols or suppositories. Suitable formulations for such modes of administration are well known and typically include surfactants that facilitate cross-membrane transfer.

The pharmaceutical compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. Therefore, pharmaceutical compositions may be sterile filtered after making the formulation, or otherwise made microbiologically acceptable. A typical composition for intravenous infusion could have a volume as much as 250 mL of fluid, such as sterile Ringer's solution, and 1-100 mg per mL, or more in antibody concentration. Therapeutic agents of the invention can all be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable sterile carrier prior to use. Lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g. with conventional immune globulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies). Dosages may have to be adjusted to compensate. The pH of the formulation will be selected to balance antibody stability (chemical and physical) and comfort to the patient when administered. Generally, pH between 6 and 8 is tolerated.

TNFSF13b plays a critical role in the pathology associated with a variety of diseases involving immune and inflammatory factors. Therefore, a pharmaceutical composition comprising an anti-hTNFSF13b human antibody of the invention can be used to treat disorders in which TNFSF13b activity is detrimental, for example immune diseases including autoimmune diseases and inflammatory diseases. Preferred disorders include, but are not limited to, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, asthma, allergic diseases, psoriasis, graft versus host disease, organ transplant rejection, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, sarcoidosis, infectious diseases, parasitic diseases, female infertility,

32

-22-

autoimmune thrombocytopenia, autoimmune thyroid disease, Hashimoto's disease, Sjogren's syndrome, and cancers, particularly B or T cell lymphomas or myelomas.

More preferably, a pharmaceutical composition comprising an anti-hTNFSF13b human antibody and/or antibody fragment of the invention is used to treat systemic lupus erythematosus.

The use of the antibody of an anti-hTNFSF13b human antibody of the present invention in the manufacture of a medicament for the treatment of at least one of the aforementioned disorders in which TNFSF13b activity is detrimental is also contemplated herein.

In certain situations, an antibody of the invention will be co-formulated with and/or co-administered with one or more additional therapeutic agents that are used in the treatment of autoimmune and/or inflammatory diseases. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

It will be appreciated by the skilled practitioner that when the antibodies of the invention are used as part of a combination therapy, a lower dosage of antibody may be desirable than when the antibody alone is administered to a subject (e.g., a synergistic therapeutic effect may be achieved through the use of combination therapy which, in turn, permits use of a lower dose of the antibody to achieve the desired therapeutic effect).

The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

-23-

Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

5 Given their ability to bind to hTNFSF13b, antibodies, of the invention can be used to detect TNFSF13b polypeptides (e.g. in a biological sample, such as serum or plasma), using a conventional immunoassay, such as an enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), an radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. The invention provides a method for detecting TNFSF13b in a biological sample comprising contacting
10 a biological sample with an antibody, or antibody portion, of the invention and detecting either the antibody (or antibody portion) bound to hTNFSF13b or unbound antibody (or antibody portion), to thereby detect hTNFSF13b in the biological sample. The antibody is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes,
15 prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine,
20 dichlorotriazinyl-amine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , or ^3H .

Alternative to labeling the antibody, TNFSF13b can be assayed in biological fluids by a competition immunoassay utilizing TNFSF13b standards labeled with a detectable
25 substance and an unlabeled anti-hTNFSF13b human antibody. In this assay, the biological sample, the labeled TNFSF13b standards and the anti-hTNFSF13b human antibody are combined and the amount of labeled TNFSF13b standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of TNFSF13b in the biological sample is inversely proportional to the amount of labeled rTNFSF13b standard bound to the anti-
30 hTNFSF13b human antibody.

In another embodiment, the present invention provides a use of an antibody that neutralizes TNFSF13b activity by binding an epitope of TNFSF13b. The epitope was

34

identified as described in Example 10. For reference, the soluble portion of hTNFSF13b is represented as follows:

Human TNFSF13b 1 AVQSPETVT QDCLOLIADS ETPTIQKSY TVVPWLLSPK 40
 41 RGSALKEKEN KILVKETGYF FIYQQVLYTD KTYAMGHLIQ 80
 81 RKKVHVFGDE LSLVTLPFCI QNMPETLPEN SCYSAGIAKL 120
 121 EEGDELQLAI PRENAQISLD GDTVFFGALK LL 152

The hTNFSF13b amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise at least one of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, glutamic acid at position 105, threonine at position 106, leucine at position 107, and asparagine at position 109. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise at least two of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, glutamic acid at position 105, threonine at position 106, leucine at position 107, and asparagine at position 109. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise at least three of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, glutamic acid at position 105, threonine at position 106, leucine at position 107, and asparagine at position 109. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise at least four of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, glutamic acid at position 105, threonine at position 106, leucine at position 107, and asparagine at position 109.

In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, and glutamic acid at position 105.

In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise glutamic acid at position 105 and at least one of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, and tyrosine at position 73. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise threonine at position 106 and at least one of the amino acids selected from the

-25-

group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, and tyrosine at position 73. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise leucine at position 107 and at least one of the amino acids selected from the group consisting of: threonine at position 69, lysine at position 71, threonine at position 72, and tyrosine at position 73. In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise asparagine at position 109 and at least one of the amino acids selected from the group consisting of: lysine at position 71, threonine at position 72, and tyrosine at position 73.

10 In another embodiment, the amino acids involved in binding the novel anti-hTNFSF13b human antibodies comprise lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, and glutamic acid at position 105.

The following examples are intended to illustrate but not to limit the invention.

15 Example 1: Generation of Anti-hTNFSF13b Human Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies were generated using the HuMAb-Mouse™ technology at Medarex by immunizing the mice with soluble hTNFSF13b (amino acids 133–285, purchased from RDI, Flanders, NJ). Both the HCo7 and HCo12 mice were used. Mice were immunized with 15 µg to 50 µg soluble hTNFSF13b in RIBI, Freund's complete adjuvant or Freund's incomplete adjuvant. Eight mice producing serum antibody titers to hTNFSF13b were injected i.v. with 10 µg hTNFSF13b in PBS. The spleen was harvested three days later from each mouse and fused with myeloma cells according to the method described in Zola (Zola, H. Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Boca Raton, FL. (1987)).

25 Hybridomas were tested for binding to hTNFSF13b and to make sure they were expressing human immunoglobulin heavy and light chains. Antibody binding to hTNFSF13b was detected by ELISA as follows:

Plates were coated with 50 µl of 5 µg/ml hTNFSF13b in PBS overnight at 4°C. Plates were then emptied and blocked with 100 µl PBS + 0.05% Tween 20 (PBST) + 5% chicken serum for 1 hour at room temperature. After washing three times with PBST, the plates were drained and 100 µl diluted secondary reagents (HRP-HuIgGFc, Jackson

-26-

was added per well. After an 1 hour incubation at room temperature plates were washed three times as described above. Plates were developed using 10 ml citrate phosphate buffer pH 4.0, 80 μ l ABTS, 8 μ l H₂O₂ per plate. After incubating 30 min. to 1 hour at room temperature, absorbance of the plates was read A415-A490. Hybridomas that
5 showed binding to hTNFSF13b and that were huIgG heavy chain and human kappa light chain were selected for subcloning.

Cell culture media of subcloned hybridomas was concentrated in Amicon ProFlux M12 tangential filtration systems using an Amicon S3Y30 UF membranes. The concentrated media was passed over protein-A Sepharose columns (5 to 20 ml column) at
10 a flow rate of 5 ml/min. The columns were washed with buffer A (PBS, pH 7.4) until the absorbance returned to baseline and the bound polypeptides were eluted with 50 mM citric acid, pH 3.2. Fractions were immediately neutralized with 1M Tris, pH 8.0. Fractions were then analyzed by SDS-PAGE. Fractions containing antibody were pooled and concentrated using an Ultrafree centrifugal filter unit (Millipore, 10 kDa molecular
15 weight cut-off).

Example 2: Functional Activity of Anti-hTNFSF13b Human Antibodies

Neutralizing activity of the anti-hTNFSF13b human antibodies of the invention was measured using a murine IL-1 dependent B cell line, T1165.17. The cells were
20 washed three times with assay media (RPMI1640 containing 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 5 x 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol and penicillin, streptomycin and fungizone) to remove IL-1. The cells were resuspended at 100,000 cells/ml in assay media containing 2.5 ng/ml soluble huTNFSF13b and plated at 5000 cells/well in a 96 well plate and incubated at 37°C in 5% CO₂. Supernatants from ELISA positive hybridomas were
25 included at a 1:4 dilution. Forty-eight hours later, 20 μ l of Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution (Madison, WI) was added and the plate incubated for 5 more hours at 37°C in 5% CO₂. Absorbance was read at A490, to measure proliferation. An example of neutralization activity for one of the hybridoma supernatants, 4A5-3.1.1-B4, is shown in Figure 1. As a control, the antibodies were added to IL-1 stimulated cells. There was no
30 evidence of inhibition of IL-1 stimulated proliferation, only the hTNFSF13b stimulated proliferation.

-27-

The neutralizing antibodies were tested for the ability to inhibit TNFSF13b augmented primary human B cell proliferation in response to anti-IgM stimulation. Primary human B cells were isolated from human blood using CD19 positive selection using the MACS magnetic isolation system (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The B cells were added to wells of a 96-well plate at 2×10^5 cells per well in complete RPMI containing 10% FCS (complete RPMI is RPMI1640 containing 10 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, and 1×10^{-5} M β -mercaptoethanol). Some of the wells were coated with 10 µg/ml anti-human IgM in PBS (BD PharMingen, Clone G20-127), overnight at 4°C and washed four times with PBS before use. Some of the cells were stimulated with soluble hTNFSF13b (25 ng/ml) in the presence or absence of neutralizing anti-hTNFSF13b antibody (2.5 µg/ml). Figure 2 illustrates the ability of 4A5-3.1.1-B4 to neutralize the stimulatory effect of hTNFSF13b.

Example 3: Characterization of Monoclonal Antibodies

All of the neutralizing anti-hTNFSF13b antibodies were either human IgG1 or human IgG4. They were also assayed for their ability to bind to hTNFSF13b in a denatured state, i.e., hTNFSF13b separated on SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose. All of the neutralizing antibodies failed to bind hTNFSF13b in a Western blot while several of the non-neutralizing antibodies were able to do so.

Experiments utilizing the BIAcore system were performed to determine if non-neutralizing antibodies and neutralizing antibodies bound to the same site on hTNFSF13b. First, 4A5-3.1.1-B4 was coated onto a chip followed by injection of hTNFSF13b and then a saturating amount of non-neutralizing antibody. Once saturation was achieved, a high concentration of 4A5-3.1.1-B4 was run over the chip. Eleven of the non-neutralizing monoclonal antibodies were unable to compete for the same binding site as 4A5-3.1.1-B4. One non-neutralizing hybridoma was able to block the binding of 4A5-3.1.1-B4 by approximately 45%, indicating that it may have an epitope near the 4A5-3.1.1-B4 epitope.

Using the same experimental design, it was also determined that the neutralizing mAb, 4A5-3.1.1-B4, could compete for the same binding site as one of the receptors for

38

-28-

hTNFSF13b, TACI. These experiments suggest that TACI-Fc and 4A5-3.1.1-B4 may have overlapping epitopes on hTNFSF13b.

4A5-3.1.1-B4 was immobilized on a solid phase by passing the antibody solution over an IMAC resin loaded with Co⁺². Following binding, the cobalt was oxidized to the +3 state by incubation of the resin with a dilute peroxide solution. After washing the resin, native hTNFSF13b and hTNFSF13b that was modified (by reduction/alkylation or by thermal denaturation) was passed over the column. After washing, the bound protein was eluted with an acidic solution and the eluted proteins were analyzed by MALDI MS. 4A5-3.1.1-B4 bound native recombinant hTNFSF13b, but did not bind either the chemically or thermally modified hTNFSF13b. Therefore, the 4A5-3.1.1-B4 appears to recognize a conformational epitope on soluble hTNFSF13b.

Recombinant soluble hTNFSF13b (RDI) was incubated with 4A5-3.1.1-B4 or anti-TNFSF13b rabbit polyclonal antibody (MoBiTec, Marco Island, FL; against amino acids 254 to 269 of hTNFSF13b) on ice for 2 hours and the protein mixture was applied to a size-exclusion HPLC (two, tandem TosoHaas TSK-GEL G3000PW columns) equilibrated in PBS at a flow rate of 0.25 ml/min. Proteins were eluted with PBS. As controls, antibody solutions and the solution of hTNFSF13b were analyzed separately. Human TNFSF13b eluted from the size exclusion column in a position consistent with a trimer of TNFSF13b molecules. The elution of trimeric hTNFSF13b shifted to an earlier timepoint in the presence of 4A5-3.1.1-B4 but not in the presence of anti-TNFSF13b polyclonal antibodies indicating the binding of trimeric hTNFSF13b to the 4A5-3.1.1-B4 antibody. This data suggests that the neutralizing mAb 4A5-3.1.1-B4 binds to a conformational epitope on hTNFSF13b.

Example 4: Affinity Measurement of Monoclonal Antibodies by BIAcore

The affinity of various anti-hTNFSF13b human antibodies for hTNFSF13b was measured using a BIAcore 2000 instrument system. The system utilizes the optical properties of Surface Plasmon Resonance to detect alteration in protein concentration of interacting molecules within a dextran biosensor matrix. Except where noted, all reagents and materials were purchased from BIAcore AB (Uppsala, Sweden). All measurements were performed at 25°C. Samples were dissolved in HBS-EP buffer (150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (w/v) surfactant P-20, and 10 mM HEPES, pH 7.4). Goat anti-

-29-

mouse IgG (Fc specific; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was immobilized on flow cell 1 on a CM5 sensor chip using the amine coupling kit. Goat anti-human IgG (Fc specific; Jackson ImmunoResearch) was immobilized on flow cell 2 also by amine coupling. Both antibodies were immobilized to reach 700 response units each.

5 Binding of recombinant hTNFSF13b (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ) was evaluated using multiple analytical cycles. Each cycle was performed at a flow rate of 30 μ l/min. and consisted of the following steps: injection of 150 μ l of 4A5-3.1.1-B4 at 20 μ g/ml, injection of 250 μ l of hTNFSF13b (starting at 50 nM and using 2 fold serial dilutions for each cycle) followed by 15 minutes for dissociation, and regeneration using
10 90 μ l of 10 mM glycine HCl, pH 1.5.

Association and dissociation rates for each cycle were evaluated using a Langmuir 1:1 binding model in the BIAevaluation software. The K_D of 4A5-3.1.1-B4 for hTNFSF13b was determined to be 38 pM.

15 Example 5: Cloning and Sequencing of Heavy and Light Chain Antigen Binding Regions

The variable region for the heavy and light chain for the neutralizing human mAb 4A5-3.1.1-B4 were cloned and sequenced using the following protocols.

mRNA was prepared from 2×10^6 hybridoma cells using the Micro-Fast Track
20 protocol (Invitrogen) supplied with the kit. cDNA was prepared from 200 μ l of ethanol precipitate of mRNA using cDNA Cycle kit (Invitrogen) by spinning the aliquot of mRNA for 30 min. at 14,000 rpm at 4°C followed by washing the pellet with 70% ethanol. The air dried pellet was resuspended in 11.5 μ l of sterile water and cDNA was prepared following the kit's instructions. The optional second round of cDNA synthesis
25 was omitted but the cDNA was cleaned using the pheno/chloroform extraction step and ethanol precipitation. The cDNA pellet was resuspended in 30 μ l of TE for use in PCR.

The PCR reactions were set up with degenerate primers at the 5' end of the variable region for the heavy and light chain paired with 3' primers in the constant region. For each 50 μ l reaction, 1 μ l of cDNA was used. The reaction was set up as directed for
30 use with PfuI followed by 20 cycles. The PCR products were checked by running 5 μ l of each reaction on a 1% agarose gel. The positive reactions were cloned using the Zero

H.D.

-30-

Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen). Minipreps from the positive clones were sequenced and analyzed for productive gene rearrangements. Results from independent PCR reactions and sequencing of multiple clones revealed the sequences as described below.

5	1	R I V L T Q S GAAATTGTGT TGAGCGAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCGGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT	R S P G E L S T S P G E P A T L S T S P G E
10			CDR1
	51	R A T L S C R A S Q S V S R Y L AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC CGCTACTTAG TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCACT CTCACAATCG GCGATGAATC	
15			
	101	A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D CCTGGTACCA GCAGAAACCT GCCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GGACCATGGT CGTCTTTGGA COGGTCCGAG GGTCCGAGGA GTAGATACTA	
20		CDR2	
	151	A S N R A T G I P A R F S G S G S GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGCC AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC CGTAGGTTGT CCCGGTGACC GTAGGGTCGG TCCAAGTCAC CGTCACCCAG	
25			
	201	G T D S T L T I S S L E P E D F TGGGACAGAC TCCACTCTCA CCACTAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG ACCCGTGCTG AGGTGAGAGT GGTAGTCGTC GGATCTCGGA CTTCTAAAAC	
30			CDR3
	251	A V Y Y C Q Q R S N W P R T F G Q CAGTTTATTA CTGTGAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCGAC GTTCGGCCAA GTCAAATAAT GACAGTCGTC GCATCGTTGA CCGGAGCCTG CAAGCCGGTT	
35			Ck →
	301	G T K V E I K R T V A A P S V F I GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCTTGACAC CGACGTGGTA GACAGAAGTA	
40			
	351	F P CTTCCCG GAAGGCG	
45			

Human antibody 4A5-3.1.1-B4 heavy chain sequences (CDRs are in bold, signal sequence is italicized).

5
1 **N** · **K H** **L W F F** **L L L** **V A A** **P R W V**
 ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
 TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

10
51 **L S Q** **V Q L** **Q Q W G** **A G L** **L K P**
 CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
 GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCCTGAC AACTTCGGAA

15
101 **S E T L** **S L T** **C A V** **Y G G S** **F S G**
 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCCTGTCTT ATGGTGGGTC CTCAGTGGT
 GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA

20
151 **Y · Y W** **S W I R** **Q P P** **G K G** **L E W I**
 TACTACTGGA GCTGGATCCG CCAGCCCCCA GGGAAAGGGC TGGAGTGGAT
 ATGATGACCT CGACCTAGGC GGTGGGGGGT CCCTTCCCGG ACCTCACCTA

25
201 **G · E I** **N H S** **G S T N** **Y N P** **S L K**
 TGGGGAATTC AATCATAGTG GAAGCACCAA CTACAACCCG TCCCTCAAGA
 ACCCCTTTAG TTAGTATCAC CTTCTGGGTT GATGTTGGGC AGGGAGTTCT

30
251 **S R V T** **I S V** **D T S** **K N Q F** **S L K**
 GTCGAGTCAC CATATCACTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCTTGAAA
 CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTT

35
301 **L · S S** **V T A A** **D T A** **V Y Y** **C A R G**
 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGCGAGAGG
 GACTCGAGAC ACTGGCGGGC CCTGTGCCGA CACATAATGA CACGCTCTCC

40
351 **Y Y D** **I L T** **G Y Y Y** **Y P D** **Y W G**
 GTATTACGAT ATTTTGACTG GTTATATTAA CTACTTTGAC TACTGGGGCC
 CATAATGCTA TAAACTGAC CAATAATAAT GATGAAACTG ATGACCCCGG

45
401 **Q G T L** **V T V** **S S A** **S T K G** **P S V**
 AGGGAACCCT GGTACCCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC
 TCCCTTGGGA CCAGTGGCAG AGGAGTCGGA GGTGGTTCCC GGTAGCCAG

50
451 **F P L** **A**
 TTCCCCCTGG CA
 AAGGGGGACC GT

55

43

Example 6: Species Crossreactivity of Anti-hTNFSF13b Human Antibodies with non-human TNFSF13b

In order to determine the species crossreactivity of the neutralizing mAbs, an ELISA was set up utilizing 4A5-3.1.1-B4 as both the capture and detecting mAb. Human recombinant TNFSF13b was used as the standard curve. Human TNFSF13b could be detected in the culture supernatant from CHO cells transfected with a vector expressing hTNFSF13b, supernatants from cultured human monocytes or human serum or plasma. Supernatants from CHO cells expressing murine TNFSF13b were tested for reactivity in the ELISA and were negative. 4A5-3.1.1-B4 was also unable to immunoprecipitate murine TNFSF13b but was able to immunoprecipitate human TNFSF13b. Murine TNFSF13b was used in the proliferation assay described in Example 2. Using this proliferation assay, 4A5-3.1.1-B4 was unable to neutralize the proliferation induced by murine TNFSF13b. This indicates that 4A5-3.1.1-B4 is unable to recognize murine TNFSF13b.

Example 7: Amino Acid sequence of Heavy Chain 4A5-3.1.1-B4

Below is the amino acid sequence of the heavy chain 4A5-3.1.1-B4 antibody which comprises the HCVR and the IgG4 constant region. The human IgG4 constant region has a serine at position 231. However, this position at 231 was substituted from a serine to a proline which introduces a structural change in the hinge region for obtaining optimal inter-chain disulfide bonds. This reduces the generation of half antibodies. Half antibodies are formed from one heavy chain and one light chain.

1	QVQLQQMGAG	LLKPSETLSL	TCAVYGGSPS	GYYNWIRQP	PGKGLEWIGE
51	INHSGSTNYN	PSLKSRVTIS	VDTSKNQFSL	KLSSVTAADT	AVYYCARGYY
101	DILTGYYYYF	DYWGQGTIVT	VSSASTKGPS	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC
151	LVKDYFPEPV	TVEWNSGALT	SGVHTFPAVL	QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG
201	TKTYTCNVDH	KPSNTKVDKR	VESKYGPSCP	PCPAPEFLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTF	EVTCTVVDVS	QEDPEVQFNW	YVDGVEVDNA	KTKPREEQFN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG	LPSSIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSQEE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWEENGQP	ENNYKTTTPV
401	LDSDGSFFLY	SRLTVDKSRW	QEGNVFSCSV	MHEALHNYHT	QKSLSLSLGK

In addition, an alanine for phenylalanine substitution at position 237 and an alanine or glutamic acid substitution for leucine at position 238 can be made to lessen the effector function of the antibody.

Example 8: Amino Acid sequence of Heavy Chain 4A5-3.1.1-B4

Below is the amino acid sequence of the heavy chain 4A5-3.1.1-B4 antibody which comprises the HCVR and the IgG1 constant region.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

1

51

101

151

201

251

301

351

401

451

QVQLQQWAG

INHSGSTNYN

DILTGYYYYF

LVKDYFPFV

TQTYICNVNH

PKPKDTLMIS

QYNSTYKVV

EPQVYTLPP

PFVLDSDGS

LLKPSETLSL

PSLKSRTTIS

DYWGQGTLV

TVSWNSGALT

KPSNTKVDEK

RTPEVTCVV

VLTVLHQDNL

RDELTKNQV

FLYSKLTVDK

TCVAVYGGSP

VDTSKNQFSL

VSSASTKGPS

SGVHTFPAVL

VEPKSCDKTH

DVSHEDPEVK

NGKEYKCKV

LTCLVKGFP

SRNQGNVFS

GYYSWIRQP

KLSSVTAADT

VFPLAPSSKS

QSSGLYSLS

TCFPCPAPEL

FNWYVDGVE

NKALPAPIEK

SDLAWEWES

CSVMHEALHN

PGKGLNWIGE

AVYYCARGY

TSGGTAALGC

VTVPSSSLG

LGGPSTVFLP

HNAKTKPRE

TISKAKGQPR

GQPENNYKTT

HYTKSLSL

Example 9: Amino Acid sequence of Light Chain 4A5-3.1.1-B4

Below is the amino acid sequence of the light chain 4A5-3.1.1-B4 antibody which comprises the LCVR and the kappa constant region.

20

1

51

101

151

201

EIVLTQSPAT

ASNRTATGIP

GTKVEIKRTV

DNALQSGNSQ

LSSPVTKSFN

LSLSPGERAT

RFSGSGSGTD

AAPSVFIFFP

ESVTEQDSKD

RGECL

LSCRASQSVS

STLTISSELP

SDEQLKSGTA

STYSLSNLT

RYLAWYQOKP

EDFAVYYCQ

SVVCLLNMFY

LSKADYERK

QCAPRLLIYD

RSNWPRTFG

PREAKVQNKV

VYACEVTHQ

Example 10: Identification of the Epitope for 4A5-3.1.1-B4

The epitope to which 4A5-3.1.1-B4 bound and neutralized human TNFSF13b was determined. Human and murine TNFSF13b sequences were aligned as shown below:

30

35

40

Mouse TNFSF13b

Human TNFSF13b

Mouse TNFSF13b

Human TNFSF13b

Mouse TNFSF13b

Human TNFSF13b

Mouse TNFSF13b

Human TNFSF13b

1

1

50

19

100

69

150

119

APQGPEETE

AVQGPEE---

DSDTPTIRK

DSFTPTIQK

TDPIFANGHV

TOKTYAMGHL

RLEEGDEIQL

KLEEGDELQL

DVDLSAPPAP

FKRGNALKEK

FKRGSALKEK

IQRIKKVHVFG

IQRIKKVHVFG

AIPRENAQIS

AIPRENAQIS

CLPGCRHSQH

ENKIVVRQTG

ENKILVKETG

DELSTLTFR

DELSTLTFR

RNGDDTFPGA

LDGDTVFFGA

DDNGMNLNNT

YFFIYBQVLY

YFFIYBQVLY

CIGNMPKTLF

CIGNMPKTLF

LKLL

LKLL

IQDCLQLIA

-----TV

99

68

149

116

183

152

A homology model was created for human TNFSF13b based on the known crystal structure for several TNF family members. Exposed residues that are different between mouse and human TNFSF13b are potential binding sites for 4A5-3.1.1-B4 since 4A5-3.1.1-B4 neutralizes human but not mouse TNFSF13b.

Three potential epitopes were identified: 1) K71, T72, Y73, E105; 2) Q26, S29, L139, D140; and 3) L53, K55, E56, K119. Mutagenesis was performed to make chimeric

-35-

molecules by changing the amino acid sequence from human to mouse. Chimera A was L139R, D140N; Chimera B was K71P, T72I, Y73F; Chimera C was K71P, T72I, Y73F, E105K; Chimera D was L53V, K55R, E56Q; Chimera E was E105K.

Using the proliferation assay as described in Example 2, all of the chimeras were tested for functional activity and neutralization by 4A5-3.1.1-B4. Initial assays were performed using supernatants from 293 transient transfections for each of the chimeras and both human TNFSF13b and murine TNFSF13b parent molecules. All of the chimeras induced similar proliferation indicating that the chimeras produced were functional. Using 6 ug/ml of 4A5-3.1.1-B4, 100% neutralization was observed with human TNFSF13b and chimeras A, B, D and E. No neutralization was observed for murine TNFSF13b or chimera C. Purified TNFSF13b mutants were produced for chimera A, B, and C and the assay was repeated using 11 ng/ml of each parent TNFSF13b or chimera TNFSF13b and 1 ug/ml of 4A5-3.1.1-B4. The results showed 100% neutralization was observed with human TNFSF13b and chimera A, 88% neutralization with chimera B, and no neutralization was observed for murine TNFSF13b or chimera C.

Example 11: In vivo studies using 4A5-3.1.1-B4

Transgenic mice overexpressing soluble human TNFSF13b are generated using established techniques as described by Hogan, B. et al. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY] as modified by Fox and Solter (Mol. Cell. Biol. 8: 5470, 1988). Briefly, a DNA fragment encompassing the hTNFSF13b gene is microinjected into the male pronuclei of newly fertilized one-cell-stage embryos (zygotes) of the FVB/N strain. The embryos are cultured in vitro overnight to allow development to the two-cell-stage. Two-cell embryos are then transplanted into the oviducts of pseudopregnant CD-1 strain mice to allow development to term. To test for the presence of the transgene in the newborn mice, a small piece of toe is removed from each animal and digested with proteinase K to release the nucleic acids. A sample of the toe extract is subsequently subjected to PCR analysis to identify transgene-containing mice.

The hTNFSF13b transgenic mice had a dramatic increase in peripheral B cells, generally about three fold compared to age and sex matched littermates. There was a slight increase in peripheral T cells as well. The hTNFSF13b transgenic mice were

26

5 treated with 4A5-3.1.1-B4 to determine if neutralization of hTNFSF13b would result in a reduction in B cell numbers back to normal levels. At 15 weeks old, female hTNFSF13b mice were injected subcutaneously twice a week for three weeks with either 25 ug of 4A5-3.1.1-B4 or isotype control antibody. Four days after the last injection of antibody, the mice were sacrificed and the spleen removed for analysis. B and T cell numbers were calculated by determining the percentage of CD19+ cells, for B cells, and CD3+ cells, for T cells using flow cytometry and absolute white blood cell count for each spleen. The results are shown below demonstrate that in vivo administration of 4A5-3.1.1-B4 to hTNFSF13b transgenic mice is able to restore the normal numbers of T and B cells

10 (average $\pm$ standard deviation)

Treatment Group	B cells ($\times 10^6$)	T cells ($\times 10^6$)
Wild type littermates	29 $\pm$ 11	46 $\pm$ 15
Transgenic + Isotype mAb	122 $\pm$ 30	75 $\pm$ 14
Transgenic + 4A5 mAb	29 $\pm$ 5	46 $\pm$ 12

47

-37-

Sequences of the present invention:**SEQ ID NO:1 → polynucleotide sequence encoding light chain variable region**

5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACT
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTAT
GATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG
10 GTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTTTATTACTGTCTAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGC
CAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACT

SEQ ID NO:2 → amino acid sequence encoding light chain variable region

15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLANYQQKPGQAPFRLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTST
LTISBLEPEDIAVYVYCCQRRSNWPRFTFGQGTKEIKRT

SEQ ID NO:3 → polynucleotide sequence encoding light chain CDR1

20

AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCC

SEQ ID NO:4 → amino acid sequence encoding light chain CDR1

25

RASQSVSRYLE

SEQ ID NO:5 → polynucleotide sequence encoding light chain CDR2

30

GATGCATCCAACAGGGCCACT

SEQ ID NO:6 → amino acid sequence encoding light chain CDR2

DASNRAT

35

SEQ ID NO:7 → polynucleotide sequence encoding light chain CDR3

CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACG

SEQ ID NO:8 → amino acid sequence encoding light chain CDR3

40

QQRSNWPRFT

SEQ ID NO:9 → polynucleotide sequence encoding heavy chain variable region

45

ATGAAA
CACCTGTGTGTTCTTCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCTCTGTC
CCAGGTGCACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA
CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTAC
50 TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGGAAGGGGCTGGAATGGATTGGGGA
AATCAATCATAGTGGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGC
TCTGTGACCGCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTA
CGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA
55 CCTGGTCAACGCTCTCTCA

SEQ ID NO:10 → amino acid sequence encoding heavy chain variable region

60

HKHLWFFLLVAAFRWVLSQVQLQQMGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYNSWIRQPPGKGLEWIGRINH
SGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYFYDYWGQGLVTVSS

H9

-38-

SEQ ID NO:11 → polynucleotide sequence encoding heavy chain CDR1

GGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGC

5 SEQ ID NO:12 → amino acid sequence encoding heavy chain CDR1

GGSFSGYYWS

10 SEQ ID NO:13 → polynucleotide sequence encoding heavy chain CDR2

GAAATCAATCATAGTGGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGT

SEQ ID NO:14 → amino acid sequence encoding heavy chain CDR2

15 EINHSGSTNYWPSLKS

SEQ ID NO:15 → polynucleotide sequence encoding heavy chain CDR3

GGGTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTAC

20 SEQ ID NO:16 → amino acid sequence encoding heavy chain CDR3

QYYDILTGTTTTFDY

25

We Claim:

1. An anti-hTNFSF13b human antibody comprising at least three of the polypeptides selected from the group consisting of:
 - 5 a. CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4;
 - b. CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6;
 - c. CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8;
 - d. CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12;
 - e. CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and
 - 10 f. CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16.
2. The antibody of claim 1 comprising at least four of the polypeptides selected from the group consisting of:
 - a. CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4;
 - b. CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6;
 - 15 c. CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8;
 - d. CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12;
 - e. CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and
 - f. CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16.
3. The antibody of claim 1 comprising at least five of the polypeptides selected from the group consisting of:
 - 20 a. CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4;
 - b. CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6;
 - c. CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8;
 - d. CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12;
 - 25 e. CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and
 - f. CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16.
4. The antibody of claim 1 comprising the polypeptides of:
 - a. CDR1 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 4;
 - b. CDR2 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 6;
 - 30 c. CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8;
 - d. CDR1 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 12;
 - e. CDR2 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 14; and

50

-40-

- f. CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16.
5. An anti-hTNFSF13b human antibody comprising a light chain variable region (LCVR) polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 or a heavy chain variable region (HCVR) polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10.
 - 5 6. The antibody of claim 5 comprising the LCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 and the HCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10.
 7. The antibody of any one of claims 1 to 6 wherein the antibody dissociates from a TNFSF13b polypeptide with K_D of 1×10^{-8} M or less.
 8. The antibody of any one of claims 1 to 7 wherein the antibody has a K_{off} rate constant of $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ or less.
 - 10 9. The antibody of any one of claims 1 to 8 wherein the antibody has an IC_{50} of 1×10^{-8} M or less.
 10. The antibody of claim 9 wherein the antibody has an IC_{50} of 1×10^{-9} M or less.
 11. The antibody of claim 10 wherein the antibody has an IC_{50} of 1×10^{-10} M or less.
 - 15 12. The antibody of claim 11 wherein the antibody has an IC_{50} of 1×10^{-11} M or less.
 13. An anti-hTNFSF13b human antibody with the following characteristics:
 - a. a K_{off} rate constant of $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ or less;
 - b. CDR3 polypeptide of the LCVR as shown in SEQ ID NO: 8; and
 - c. CDR3 polypeptide of the HCVR as shown in SEQ ID NO: 16..
 - 20 14. The antibody of any one of claims 1 to 13 which comprises a heavy chain constant region selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD, and IgD.
 15. The antibody of claim 14 wherein the heavy chain constant region is IgG1 or IgG4.
 - 25 16. The antibody of claim 15 wherein the heavy chain constant region is IgG4.
 17. The antibody of claim 16 wherein the IgG4 has a proline substituted for serine at position 231.
 18. The antibody of any one of claims 1 to 17 which comprises a kappa or lambda light chain constant region.
 - 30 19. The antibody of claim 18 which comprises a kappa light chain constant region.
 20. The antibody of any one of claims 1 to 19 wherein a CDR has three or less conservative amino acid substitutions.

51

-41-

21. The antibody of claim 20 wherein a CDR has two or less conservative amino acid substitutions.
22. The antibody of claim 21 wherein a CDR has one conservative amino acid substitution.
- 5 23. An anti-hTNFSF13b human antibody comprising a light chain comprising a LCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 and a kappa constant region and a heavy chain comprising the HCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10 and a IgG4 constant region with a proline substituted for serine at position 231.
- 10 24. An isolated nucleic acid that encodes for the amino acid sequence of any of the antibodies of claims 1 to 23.
25. A recombinant expression vectors encoding an antibody of any one of claims 1 to 23.
26. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any of claims 1-23.
- 15 27. The pharmaceutical composition of claim 26 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.
28. A method for inhibiting TNFSF13b activity in a subject suffering from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental comprising administering the antibody of any one of claims 1-23.
- 20 29. The method of claim 28 wherein the disorder is selected from the group consisting of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, asthma, allergic diseases, psoriasis, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, organ transplant rejection, graft-versus-host disease, sarcoidosis, infectious diseases, parasitic diseases, female infertility, autoimmune thrombocytopenia, autoimmune thyroid disease, Hashimoto's disease, Sjogren's syndrome, and cancer.
- 25 30. The method of claim 29 wherein the disorder cancer.
31. The method of claim 29 wherein the disorder is organ transplant rejection or graft-versus-host disease.
- 30 32. The method of claim 29 wherein the disorder is systemic lupus erythematosus.

52

-42-

33. A use of the antibody of any one of claims 1-23 in the manufacture of a medicament for administration to subject suffering from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental.
34. The use of claim 33 wherein the disorder is selected from the group consisting of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, asthma, allergic diseases, psoriasis, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, organ transplant rejection, graft-versus-host disease, sarcoidosis, infectious diseases, parasitic diseases, female infertility, autoimmune thrombocytopenia, autoimmune thyroid disease, Hashimoto's disease, Sjogren's syndrome, and cancer.
35. The use of claim 34 wherein the disorder is organ transplant rejection or graft-versus-host disease.
36. The use of claim 36 wherein the disorder is cancer.
37. The use of claim 36 wherein the disorder is systemic lupus erythematosus.
38. A use of an antibody that neutralizes TNFSF13b activity by binding an epitope of TNFSF13b, wherein the epitope comprises lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, and glutamic acid at position 105, : . . . , in manufacture of a medicament for administration to subject suffering from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental.
39. An article of manufacture comprising a packaging material and an antibody contained within said packaging material, wherein the antibody neutralizes TNFSF13b activity for treatment or prevention of a human subject suffering from a disorder in which TNFSF13b activity is detrimental, and wherein the packaging material comprises a package insert which indicates that the antibody neutralizes by binding an epitope of TNFSF13b, wherein the epitope comprises lysine at position 71, threonine at position 72, tyrosine at position 73, and glutamic acid at position 105.
40. The article of manufacture of claim 39, wherein the antibody is any of claims 1-23.

57

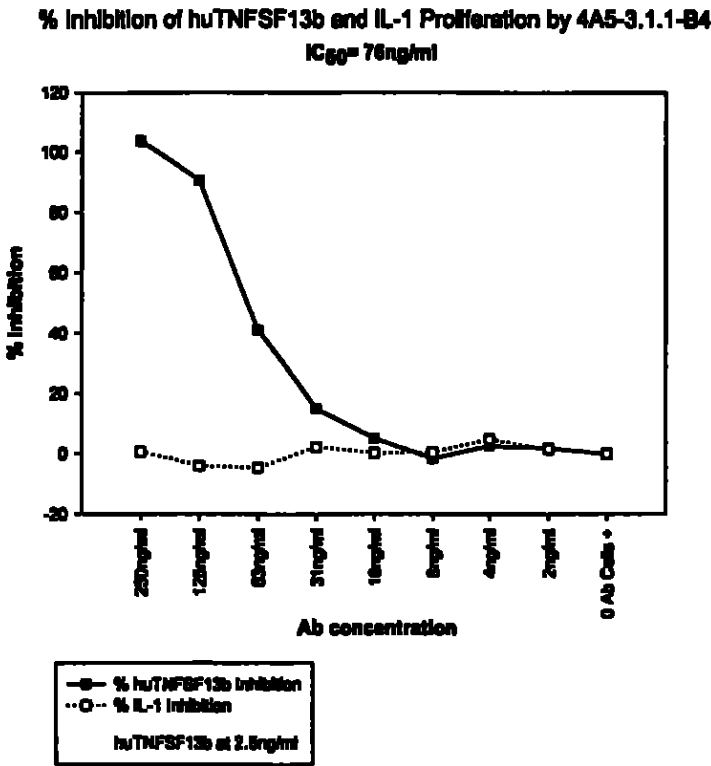
-43-

41. The article of manufacture of claim 40, wherein the antibody comprises the LCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 2 and the HCVR polypeptide as shown in SEQ ID NO: 10.

5

54

Fig. 1/2

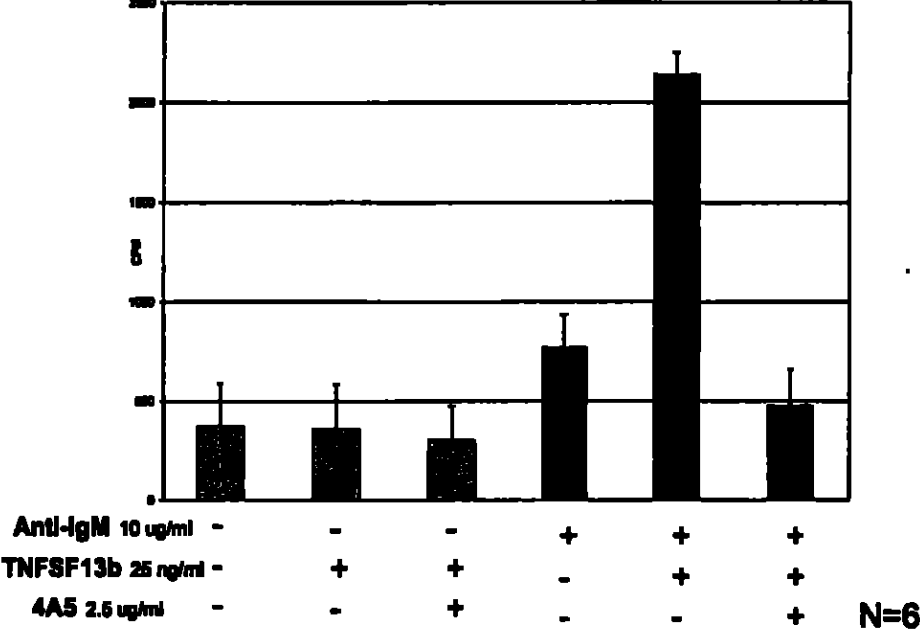


57

Fig. 2/2

5

Neutralization of huTNFSF13b induced proliferation with 4A5-3.1.1-B4 in primary B cells



10

56

P-15239.ST25-2.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTAGONISTIC ANTI-HTNFSF13b HUMAN ANTIBODIES

<130> X-15239

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgctacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac tccactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaact 327

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr

57

20 P-15239.ST25-2.txt 30
25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
agggccagtc agagtgttag ccgctactta gcc 33

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

58

gatgcatcca acagggccac t P-15239.ST25-2.txt 21

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cagcagcgta gcaactggcc tcggacg 27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 9
<211> 426
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(57)

59

P-15239.ST25-2.txt

<223>

<400> 9
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcaactac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccttcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggg tactactgga gctggatccg ccagccccca 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatagtg gaagcaccaa ctacaaccg 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaaa 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtgtattact gtgagagagg gtattacgat 360
attttgactg gttattatta ctactttgac tactggggcc agggaaacct ggtcacccgtc 420
tcctca 426

<210> 10
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(19)
<223>

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

60
60

P-15239.ST25-2.txt

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
115 120 125
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
ggtaggggcct tcagtgggta ctactggagc

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
gaaatcaatc atagtgaag caccaactac aaccggtccc tcaagagt

<210> 14
<211> 16

61

P-15239.ST25-2.txt

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 45
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gggtattacg atattttgac tggttattat tactactttg actac 45

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Thr Thr Thr Thr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

62

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
27 de febrero de 2003 (27.02.03)

(Código de Barras)
OMPI

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/018488 A2

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patente : C12N

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT / US 02 / 21842

(22) Fecha de Presentación Internacional: 18 de agosto de 2002 (18.08.02)

(23) Idioma de presentación: Inglés

(28) Idioma de publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:

60/312,808 18 de agosto de 2001 (18.08.2001) US
(71) Solicitante (designado para todos los países excepto Estados Unidos)
ELI LILLY AND COMPANY [E.E.U.U./E.E.U.U.]; Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285 (E.E.U.U.)
(72) Inventores e;
(73) Inventores/solicitantes (sólo para Estados Unidos): GELFANDOVA,
Valentina, Pavlovna [BY/US]; 8114 Lakewood Drive #172, Indianapolis, IN 46224
(US); HALE, John, Edward [US/US]; 7844 Forest Drive, Fishers, IN 46038 (US).
KIKLY, Kristina, Kay [US/US]; 8488 North, 50 East, Fortville, IN 46040 (US).
WITCHER, Derrick, Ryan [US/US]; Parrot Court, Fishers, IN 46038, (US);
RATHNACHALAM, Radhakrishnan [IN/US], 3763 Latice Court, Carmel, IN
46032 (US).

(74) Agentes: COX, Gregory A. et al; Eli Lilly and Company, P.O. Box 8288,
Indianapolis IN 46208-8288 US.

(81) Estados Designados (fase nacional) : EA, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Estados Designados (fase regional) : Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones bajo la regla 4.17:

Por lo que se refiere a la capacidad del titular para solicitar y que le sea
concedida una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, GU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, DR, DZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, PH, PL, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, DZ, MD, RU,
TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Por lo que se refiere a la capacidad del titular para reivindicar la prioridad de
una solicitud anterior (Regla 4.17(iii)) para las siguientes designaciones: AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, DR, DZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, TD, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, BF, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR) OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Publicada:

Sin informe de búsqueda internacional para ser publicada de nuevo tras la
recepción de dicho informe.

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, consultar con la Guía de
Códigos y Abreviaturas que aparecen al comienzo de cada informe
periódico de la Gaceta de PCT.

(54) Título : ANTICUERPOS HUMANOS ANTAGONISTAS CONTRA h TNFSF13 b

(57) Resumen: Se describen anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a polipéptidos TNFSF13 b que se unen específicamente a
polipéptidos TNFSF13 b. Estos anticuerpos presentan afinidad elevada por h TNFSF13 b (Por ejemplo KD=10-8M o menor), una lenta velocidad de disociación
de TNFSF13b in vitro e in vivo. Los anticuerpos de la invención son de utilidad en una realización para inhibir la actividad de TNFSF13b en un sujeto humano
que padece un trastorno en el que la actividad de hTNFSF13b es perjudicial. También están comprendidos en la invención los ácidos nucleicos que codifican los
anticuerpos de la presente invención, así como los vectores y células hospedadoras para su expresión.

63

ANTICUERPOS HUMANOS ANTAGONISTAS CONTRA hTNFSF13b

Es sabido que los ligandos de la familia TNF están entre las citoquinas más pleotrópicas, que inducen un gran número de respuestas celulares, incluyendo la proliferación, citotoxicidad, actividad antivírica, actividades inmunorreguladoras y la regulación transcripcional de diversos genes. La familia TNF de citoquinas y receptores ha sufrido una gran expansión en los estos últimos años con el advenimiento de la secuenciación EST masiva. TNFSF13b es el nombre oficial adoptado en el Congreso de TNF para BlyS, TALL-1, BAFF, THANK, neutroquina- α , y zTNF (para una revisión véase Locksley y cols. Cell 2001 104: 487). La TNFSF13b humana (hTNFSF13b) es una proteína unida a la membrana de tipo II de 285 aminoácidos que posee un sitio de escisión en el extremo N que permite la existencia de proteínas solubles y unidas a la membrana. Funcionalmente, TNFSF13b parece regular las respuestas inmunitarias de los linfocitos B y algunos linfocitos T.

Los estudios sobre el síndrome de choque séptico y otros trastornos se originan por la producción excesiva de citoquinas inflamatorias han demostrado que un hospedador que la sufre a menudo contrarrestará los altos niveles de citoquinas mediante la liberación de receptores de citoquinas solubles o sintetizando anticuerpos contra citoquinas de afinidad elevada. Se considera que los procedimientos de tratamiento que imitan tales respuestas naturales son estrategias terapéuticas viables para aliviar la enfermedad mediada por citoquinas. Así, hay una necesidad bien reconocida de anticuerpos humanos que se unen a citoquinas, tales como TNFSF13b, que están implicadas en la regulación de procesos inmunitarios celulares con afinidad elevada y que

64

-2-

5 tienen capacidad de antagonizar la actividad de la citoquina diana *in vitro* e *in vivo*. Aunque la solicitud de patente internacional WO00/50597 se refiere de forma no descriptiva a anticuerpos dirigidos contra TNFSF13b, esa solicitud no describe específicamente las características estructurales o funcionales de tales anticuerpos.

10 La presente invención proporciona anticuerpos humanos o porciones de los mismos que se unen a antígenos contra hTNFSF13b. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por la unión con afinidad elevada a los polipéptidos TNFSF13b, cinética de disociación lenta y la capacidad de actuar como agonistas de al menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada a los polipéptidos TNFSF13b.

15 La presente invención proporciona también anticuerpos humanos contra hTNFSF13b que comprenden un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 2, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 4, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 6, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 8, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 10, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 12, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 14, y un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 16.

20 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo humano contra hTNFSF13b aislado que se une a un polipéptido hTNFSF13b y se disocia del polipéptido hTNFSF13b con una constante de velocidad de disociación K_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor, según se determina mediante resonancia de plasma superficial, o que inhibe la proliferación inducida por
25 TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o

menor.

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo humano contra hTNFSF13b aislado que tiene las siguientes características:

- a) Inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menor;
- b) tiene una CDR3 en la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16; y
- c) tiene una CDR3 en la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8.

La invención proporciona también procedimientos para tratar o prevenir enfermedades o afecciones agudas o crónicas asociadas a la actividad de los linfocitos B y algunos linfocitos T que incluyen, pero sin limitación, trastornos autoinmunitarios, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, y/o neoplasia que comprende la administración de un anticuerpo humano contra hTNFSF13b de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona secuencias que codifican los anticuerpos humanos contra hTNFSF13b novedosos, vectores que comprenden las secuencias polinucleotídicas que codifican anticuerpos humanos contra hTNFSF13b, células hospedadoras transformadas con vectores que incorporan polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanos contra hTNFSF13b, formulaciones que comprenden anticuerpos humanos contra hTNFSF13b y procedimientos para prepararlos y usarlos.

En otra realización, la presente invención proporciona el epítopo del antígeno al que se unen los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b. Así, la invención proporciona también un uso de un anticuerpo

que se une al epítopo de la presente invención neutralizando de este modo la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos agudos o crónicos asociados a la actividad de los linfocitos B y algunos linfocitos T que incluyen, pero sin limitación, trastornos autoinmunitarios, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, y/o neoplasia.

La invención comprende también un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y un anticuerpo contenido dentro de dicho material de envasado, en el que el anticuerpo neutraliza la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de que un sujeto humano padezca un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial y en el que el material de envasado comprende un prospecto que indica que el anticuerpo neutraliza uniéndose a un epítopo de TNFSF13b, en el que el epítopo comprende lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105; y un prospecto que toma las medidas para la administración de la forma farmacéutica que da como resultado la neutralización de la actividad de TNFSF13b.

Fig. 1. Gráfica que ilustra la inhibición de hTNFSF13b y la proliferación inducida por IL-1 de las células T1165.17 por el anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4.

Fig. 2. Gráfica que ilustra la neutralización de la proliferación inducida por hTNFSF13b por el anticuerpo humano 4A5-3.1.1-B4 en linfocitos B humanos estimulados con anti-IgM.

Para que la presente invención pueda ser comprendida más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

67

-5-

Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que comprende cuando cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas mediante puentes disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alpha, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente memoria como HCVR) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3 para IgG, IgD e IgA, y 4 dominios, CH1, CH2, CH3, CH4 para IgM e IgE. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (que se abrevia en la presente memoria como LCVR) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones armazón (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, que se disponen desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con convenios notorios. [Kabat, *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242 (1991); Chothia, y cols., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia, y cols., *Nature* 342: 878-883 (1989)]. Las características

funcionales del anticuerpo para unirse a un antígeno particular son determinadas por las CDR.

En la presente descripción el término "anticuerpo" se pretende que se refiera a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, o fragmento monocatenario de FV. Preferiblemente el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a las secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. Los anticuerpos humanos tienen varias ventajas sobre los anticuerpos quiméricos cuando se usan en la terapia humana. Por ejemplo, la porción efectora de un anticuerpo humano puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruir las células diana de forma más eficiente mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)). Otra ventaja es que el sistema inmunitario humano no debería reconocer el anticuerpo humano como exógeno y, por lo tanto, la respuesta de los anticuerpos contra un anticuerpo de ese tipo inyectado debería ser menor que contra un anticuerpo totalmente exógeno o un anticuerpo quimérico parcialmente exógeno. Además, se ha reseñado que los anticuerpos no humanos inyectados poseen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a la de los anticuerpos humanos naturales, permitiendo la administración de dosis menores y menos frecuentes.

El término "hTNFSF13b" se refiere a la forma humana de un ligando miembro de la familia del factor de necrosis tumoral que se describe en las solicitudes de patentes internacionales WO98/18921 y WO00/50597 (que en la presente memoria se denominan neutroquina- α). El término "TNFSF13b" se pretende que englobe hTNFSF13b así como homólogos de hTNFSF13b derivados de otras especies. Los términos "hTNFSF13b" y "TNFSF13b" se pretende que incluyan las formas de los mismos, que pueden prepararse mediante procedimientos de expresión recombinadas o pueden comprarse en el mercado (Research Diagnostics Inc. n° de catálogo RDI-3113, rhuBAFF, Flanders, N.J.) así como generarse sintéticamente.

La frase "propiedad biológica", "característica biológica", y el término "actividad" en relación a un anticuerpo de la presente invención se usan de forma intercambiable en la presente memoria e incluyen, pero sin limitación, afinidad y especificidad de epítopos (por ejemplo, anticuerpo humano contra hTNFSF13b que se une a hTNFSF13b), capacidad de antagonizar la actividad del polipéptido diana (por ejemplo, la actividad de TNFSF13b), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunógenas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables de un anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos del polipéptido diana, o con otras proteínas o tejidos, de forma general), y capacidad de preservar niveles elevados de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, ELISA, ELISA competitivo, análisis por resonancia de plasma superficial,

ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, Ejemplo 2), e inmunohistoquímica con secciones de tejido de fuentes diferentes incluyendo fuentes humanas, primates o cualquier otra fuente que sea necesaria. Las actividades y propiedades biológicas particulares de los anticuerpos humanos
5 contra hTNFSF13b se describen en más detalle en los siguientes Ejemplos.

La frase "posición de contacto" incluye una posición de aminoácido en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de la cadena pesada o de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que es ocupada por un aminoácido que se pone en contacto con el antígeno. Si un aminoácido de
10 CDR se pone en contacto con el antígeno, entonces se puede considerar que ese aminoácido ocupa una posición de contacto.

"Sustitución conservadora" o "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos, ya sea por mutaciones naturales o manipulación humana, en la que los anticuerpos producidos por sustituciones
15 de ese tipo tienen sustancialmente la(s) misma(s) (o mejorada(s) o reducida(s), según se desee) actividad(es) que los anticuerpos que se describen en la presente memoria.

El término "epítipo" como se usa en la presente memoria se refiere a una región de una molécula de proteína a la que puede unirse un anticuerpo.
20 Un "epítipo inmunógeno" se define como la parte de una proteína que desencadena una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa es el inmunógeno.

El término "unirse" como se usa en la presente memoria, en general se refiere a la interacción del anticuerpo con el epítipo del antígeno. Más
25 específicamente, el término "unirse" se refiere a la afinidad del anticuerpo por

21

el epítopo del antígeno. La afinidad se mide mediante K_D .

El término "inhibir" o "inhibición" incluye el significado generalmente aceptado, que incluye la neutralización, prohibición, prevención, restricción, ralentización, detención o inversión de la progresión o gravedad de una enfermedad o afección.

El término "neutralizar" o "antagonizar" refiriéndose a un anticuerpo contra TNFSF13b o la frase "anticuerpo que actúa como antagonista de la actividad de TNFSF13b" se pretende que se refiera a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo cuya unión a TNFSF13b da como resultado la inhibición de una actividad biológica inducida por polipéptidos TNFSF13b. La inhibición de la actividad biológica de TNFSF13b puede evaluarse midiendo uno o más de los indicadores *in vitro* o *in vivo* de la actividad biológica de TNFSF13b que incluyen, pero sin limitación, proliferación inducida por TNFSF13b, secreción de inmunoglobulinas inducida por TNFSF13b, prevención de la apoptosis de linfocitos B inducida por TNFSF13b, o inhibición de la unión al receptor en un ensayo de unión a los receptores de TNFSF13b. Los indicadores de la actividad biológica de TNFSF13b pueden evaluarse mediante uno o más de los diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* que se conocen en la técnica. (véase, por ejemplo, Moore, P.A., y cols., *Science*, 285: 260-263 (1999); Schneider, P., y cols., *J. Exp. Med.*, 189: 1747-1756 (1999); Shu, H., y cols., *J. Leuko. Biol.*, 65: 680-683 (1999); Mukhopadhyay, A., y cols., *J. Biol. Chem.*, 274: 15978-15981 (1999); Mackay, F. y cols., *J. Exp. Med.*, 190: 1697-1710 (1999); Gross, J.A., y cols., *Nature*, 404: 995-999 (2000); y el Ejemplo 2). Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo de neutralizar o antagonizar la actividad de TNFSF13b se evalúa por la inhibición de la proliferación de

22

linfocitos B como se muestra en el Ejemplo 2.

El término " K_{off} ", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a la constante de velocidad de disociación "off" de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

5 El término " K_D ", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a la constante de disociación de la velocidad de disociación ("off") dividida entre la velocidad de asociación ("on") de una interacción particular entre anticuerpo y antígeno. Para los fines de la presente invención K_D se determinó como se muestra en el Ejemplo 4.

10 Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con el uso diagnóstico o terapéutico del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. De forma ordinaria, un anticuerpo
15 aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) más del 95% en peso del anticuerpo como se determina mediante el procedimiento de Lowry y, lo más preferiblemente, más del 99% en peso y, (2) hasta que sea homogéneo mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul
20 de Coomassie o, preferiblemente, tinte de plata. Preferiblemente, un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNFSF13b sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del
25 polipéptido hTNFSF13b).

La frase "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatentaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

La frase "molécula de ácido nucleico aislada", como se usa en la presente memoria en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, HCVR, LCVR, CDR3) que se unen al polipéptido hTNFSF13b, incluyen una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias nucleotídicas que codifican el anticuerpo, o la porción de anticuerpo, están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos distintos del polipéptido hTNFSF13b, secuencias distintas que pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Así, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región de HCVR de un anticuerpo humano contra hTNFSF13b no contiene otras secuencias que codifiquen regiones de HCVR que se unen a antígenos distintos del polipéptido hTNFSF13b.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden

7A 85

integrarse en el genoma de una célula hospedadora al ser introducidos en la célula hospedadora y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están ligados de forma operable. Tales vectores se denominan en la presente memoria as "vectores de expresión recombinados" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinado están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión de ese tipo, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus sin capacidad de replicación, adenovirus, y virus adenoasociados), que realizan funciones equivalentes.

Un ácido nucleico está "ligado operablemente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o director de secreción está ligado operablemente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operablemente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosomas está ligado operablemente a una secuencia codificadora si está situada de forma que facilite la traducción. Generalmente, "ligado operablemente" quiere decir que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un director de secreción, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los promotores no tienen que estar contiguos. El enlace se logra mediante ligado en sitios de restricción

75
26

convenientes. Si no existen sitios de ese tipo, se usan adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o conectores de acuerdo con la práctica convencional.

El término "recombinado" en referencia a un anticuerpo incluye
5 anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios de recombinación. Los ejemplos representativos incluyen anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinado transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una genoteca humana de anticuerpos de combinación, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que
10 son transgénicos para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante medios que implican el ajuste de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinados tienen regiones variables y constantes que se derivan de las secuencias de inmunoglobulina germinales
15 humanas.

La frase "célula hospedadora recombinada" (o simplemente "célula hospedadora") incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinado. Debe entenderse que tales términos se pretende que se refieran no solo a la célula sujeto en particular sino a la progenie de una
20 célula de ese tipo. Debido a que pueden darse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, la progenie de ese tipo puede, de hecho, no ser idéntica a la célula progenitora, pero siguen estando incluidas en el alcance del término "célula hospedadora" como se usa en la presente memoria.

25 Los anticuerpos humanos recombinados pueden someterse también a

mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, a mutagénesis somática *in vivo*) y, así, las secuencias de aminoácidos de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinados son secuencias que, aunque se derivan de las relacionadas con las secuencias
5 germinales de HCVR y LCVR, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Pueden emplearse animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, al ser inmunizados, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La
10 transferencia del conjunto de genes de la línea germinal de inmunoglobulina humana a los ratones mutantes para las líneas germinales de ese tipo dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al ser expuestos a antígenos (véase, por ejemplo, Jakobovits, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555, (1993); Jakobovits, y cols., *Nature*, 362: 255-258, (1993);
15 Bruggemann, y cols., *Year in Immun.*, 7: 33 (1993); *Nature* 148: 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Gross, J.A., y cols., *Nature*, 404: 995-999 (2000); y las patentes de Estados Unidos nº 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825 y 5.545.806 (cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como
20 referencia en su totalidad para todos los fines)). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en adenotecas de macrófagos display (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1992); Marks, y cols., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). También están disponibles las técnicas de Cole y cols. y Boerner, y cols. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos
25 (Cole, y cols., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therap*, Alan R. Liss, p. 77

77/26

(1985) y Boerner, y cols., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)).

"Envase" quiere decir cualquier receptáculo y cierre adecuado para almacenar, enviar, dispensar y/o manipular un producto farmacéutico.

"Material de envasado" quiere decir un dispositivo fácil de usar por el cliente que permite una administración conveniente y/o dispositivos auxiliares que ayudan en la entrega, educación y/o administración. El material de envasado puede mejorar la administración del anticuerpo al paciente, reducir o mejorar la instrucción educacional del paciente, proporcionar una plataforma para estudios económicos sanitarios mejorados y/o limitar la carga de trabajo de los canales de distribución. También, el material de envasado puede incluir pero sin limitación, un envase con base de papel, envase envuelto para reducir el tamaño, envase con cubierta que permita la visión, cupones para prueba-uso, materiales de educación, suministros auxiliares y/o dispositivo de administración.

"Prospecto" quiere decir la información que acompaña al producto que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia necesarios para permitir que el médico, farmacéutico y paciente puedan tomar una decisión informada con respecto al uso del producto y/o información de educación para el paciente. El prospecto generalmente se considera como la "etiqueta" de un producto farmacéutico.

Un **"sujeto"** quiere decir un mamífero; preferiblemente un ser humano que necesite un tratamiento. En lo que se refiere a la presente invención los sujetos que necesitan tratamiento incluyen mamíferos que padecen o tienen predisposición a padecer un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial, por ejemplo enfermedades inmunitarias, que incluyen



enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Los trastornos preferidos incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, enfermedades
5 alérgicas, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de órganos trasplantados, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada al trasplante de órganos, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, parasitosis, infertilidad en la mujer, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren, y cánceres,
10 en particular linfomas o mielomas de linfocitos B o T.

Diversos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en las subsecciones siguientes.

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que son específicos y neutralizan polipéptidos TNFSF13b bioactivos. También
15 se describen las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras que son altamente específicas y neutralizan los polipéptidos TNFSF13b cuando se unen a ellos. Esta elevada especificidad permite a los anticuerpos humanos contra hTNFSF13b, y a los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad similar ser inmunoterapia en las enfermedades asociadas a
20 TNFSF13b.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado humano que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ó 16 y que se une a un epítopo del polipéptido TNFSF13b con afinidad elevada, se disocia de un
25 polipéptido TNFSF13b unido con una constante K_{off} de velocidad de

disociación baja de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor, y tiene capacidad de actuar como antagonista de la actividad del polipéptido TNFSF13b. En una realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en: polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 16. En otra realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende al menos dos de los polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 16. En otra realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende al menos tres de los polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se

muestra en la SEQ ID N°: 16. En otra realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende al menos cuatro de los polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 16. En otra realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende al menos cinco de los polipéptidos que se seleccionan del grupo que consiste en: polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 16. En otra realización, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende los polipéptidos del polipéptido de la CDR1 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 4; polipéptido de la CDR2 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 6; polipéptido de la CDR3 de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 8; polipéptido de la CDR1 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 12; polipéptido de la CDR2 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y polipéptido de la CDR3 de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 16.

Más preferiblemente, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b

comprende un polipéptido de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se muestra en la SEQ ID N°: 2 o un polipéptido de la región variable de la cadena pesada (HCVR) como se muestra en la SEQ ID N°: 10. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo humano contra hTNFSF13b comprende el polipéptido de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 2 y el polipéptido de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N°: 10.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado humano se disocia de un polipéptido TNFSF13b unido con una constante K_{off} de velocidad de disociación de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menor e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menor. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo humano aislado se disocia de un epítopo del polipéptido TNFSF13b con una constante K_{off} de velocidad de disociación de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menor e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo de proliferación *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menor. En una realización todavía más preferida, el anticuerpo humano contra TNFSF13b aislado se disocia de un polipéptido hTNFSF13b unido con una constante K_{off} de velocidad de disociación de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ o menor e inhibe la proliferación inducida por TNFSF13b en un ensayo *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menor. Ejemplos de anticuerpos humanos contra hTNFSF13b que cumplen los anteriores criterios cinéticos y de neutralización incluyen los anticuerpos 4A5-3.1.1-B4.

El anticuerpo humano más preferido contra hTNFSF13b de la presente invención se denomina en la presente memoria 4A5-3.1.1-B4. 4A5-3.1.1-B4 tiene secuencias de polipéptidos de la LCVR y la HCVR como se muestran en la SEQ ID N°: 2 y en la SEQ ID N°: 10, respectivamente. Las secuencias de

polinucleotidos que codifican la LCVR y la HCVR de 4A5-3.1.1-B4 se muestran en la SEQ ID N°: 1 y la SEQ ID N°: 9, respectivamente. Las propiedades de los anticuerpos humanos contra hTNFSF13b de la presente invención se describen específicamente en los Ejemplos. Particularmente notable es la elevada afinidad por el polipéptido TNFSF13b, la cinética de disociación lenta y la elevada capacidad como antagonista de la actividad del polipéptido TNFSF13b que demuestra 4A5-3.1.1-B4.

La K_{off} de un anticuerpo humano contra hTNFSF13b puede determinarse mediante resonancia de plasma superficial como se describe de forma general en el Ejemplo 4. Generalmente, el análisis por resonancia de plasma superficial mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (polipéptido TNFSF13b recombinada inmovilizado sobre una matriz de biosensor) y el analito (anticuerpos en solución) mediante resonancia de plasma superficial (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). El análisis por SPR puede realizarse también inmovilizando el analito (anticuerpos en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (TNFSF13b recombinada en solución).

En un aspecto, la presente invención se refiere también a las líneas celulares que producen anticuerpos humanos contra hTNFSF13b de la presente invención. El aislamiento de líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales de la invención puede lograrse usando técnicas rutinarias de detección conocidas en la técnica. Un híbrdoma que produce un anticuerpo humano contra hTNFSF13b de la presente invención ha sido depositado en ATCC, (ATCC PTA-3674) como se describe en la presente memoria.

03
Sfi

Puede usarse una amplia variedad de sistemas de hospedadores de expresión para expresar los anticuerpos de la presente invención que incluyen sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, baculovíricos, vegetales y mamíferos (así como sistemas de expresión de macrofágos display). Un
5 ejemplo de un vector bacteriano adecuado es pUC119 (Sfi). En la técnica se conocen también otros sistemas de expresión de anticuerpos y se contemplan en la presente memoria.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse mediante expresión recombinada de los genes de las cadenas ligeras y pesadas de la
10 inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo de forma recombinada, se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinados que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina del anticuerpo tal que las cadenas ligeras y pesadas se expresen en la célula hospedadora.
15 Preferiblemente, los anticuerpos recombinados se seleccionan en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras, y desde este medio se pueden recuperar los anticuerpos. Para obtener los genes de las cadenas pesadas y ligeras se usan metodologías de ADN recombinado estándar, para incorporar estos genes en vectores de expresión recombinados e introducir los vectores
20 en las células hospedadoras.

El ADN aislado que codifica la región HCVR puede convertirse en un gen de la cadena pesada completo ligando operablemente el ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de ADN de los genes de la
25 región constante de la cadena pesada son conocidas en la técnica y pueden

obtenerse fragmentos de ADN que comprenden estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica de ellas como se describe en Kabat, (Kabat, *et al*,
5 *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH nº. 91-3242 (1991)), pero lo más preferiblemente es una región constante de IgG1, o IgG4. De forma alternativa, la porción del anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento Fab', F(ab')₂, o un fragmento de FV monocatenario. Para un
10 fragmento del gen de la cadena pesada de Fab, el ADN que codifica la HCVR puede estar ligado operativamente a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante de la cadena pesada de CH1.

El ADN aislado que codifica la región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera completo (así como un gen de cadena ligera de Fab)
15 ligando operativamente el ADN que codifica LCVR a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de ADN de los genes de región constante de la cadena ligera humana son conocidas en técnica y pueden obtenerse fragmentos de ADN que comprenden estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la
20 cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFV, los fragmentos de ADN que codifican HCVR y LCVR se ligan operablemente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser- Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (Gly₄-Ser)₃, tal que las
25 secuencias de HCVR y LCVR puedan expresarse en forma de proteína

monocatenaria, estando las regiones LCVR y HCVR unidas mediante el conector flexible (véase por ejemplo, Bird y cols. *Science* 242: 423-426 (1988); Huston, y cols., *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); McCafferty, y cols., *Nature* 348: 552-554 (1990)).

- 5 Para expresar los anticuerpos de la invención, se insertan ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidas como se describe anteriormente en vectores de expresión de forma tal que los genes estén ligados operativamente a secuencias de control de transcripción y traducción. El gen del anticuerpo está ligado en un vector tal que las
- 10 secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector desempeñen su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen de forma que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión que se use. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de
- 15 la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, ligado de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y en el vector, o ligado
- 20 de extremos romos si no hay presentes sitios de restricción). Además, o de forma alternativa, el vector de expresión recombinado puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo humano contra hTNFSF13b desde una célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo humano contra hTNFSF13b puede clonarse en el vector de tal
- 25 forma que el péptido de señal esté ligado en marco con el extremo amino del

gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de la inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no sea una inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de
 5 expresión recombinados de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. Las secuencias reguladoras comprenden promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los
 10 genes de la cadena del anticuerpo. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteínas deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células
 15 hospedadoras de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), Virus Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo el promotor tardío
 20 principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma.

Además de los genes de las cadenas de los anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinados de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo,
 25 orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador

seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes
5 marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en las células hospedadoras dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para la selección con G418).

Para la expresión de cadenas ligeras y pesadas, el (los) vector(es) de
10 expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfecta(n) en una célula hospedadora mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" se pretende que incluyan una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación,
15 precipitación con calcio y fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células procariotas o eucariotas, lo más preferido es la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferiblemente en células hospedadoras de mamífero, porque las células eucariotas de ese tipo, y en
20 particular las células de mamífero tienen una tendencia mayor que las células procariotas a ensamblar y segregar un anticuerpo plegado de forma apropiada e inmunológicamente activo. Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinados de la Invención incluyen las células ováricas de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células dhfr-
25 CHO, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220

(1980), usadas con el marcador seleccionable DHFR, por ejemplo como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, *Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982)), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinados que codifican genes de anticuerpos se introducen en

5 células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo

10 usando procedimientos estándar de purificación de proteínas.

También pueden usarse células hospedadoras para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab de moléculas de scFV. Se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar

15 una célula hospedadora con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no las dos) de un anticuerpo de esta invención. También puede usarse la ingeniería genética para eliminar parte o todo el ADN que codifica cualquiera o ambas de las cadenas ligera o pesada que no sea necesario para unirse a hTNFSF13b. Las moléculas expresadas a partir de moléculas

20 truncadas de ADN están comprendidas también en los anticuerpos de la invención. En un sistema para la expresión recombinada de un anticuerpo de la invención, se introduce un vector de expresión recombinado que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por calcio y fosfato. Dentro

25 del vector de expresión recombinado, los genes de la cadena pesada y ligera

del anticuerpo están ligados operativamente a elementos reguladores potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador de CMV / promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40 / promotor de AdMLP)

5 para inducir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinado porta también un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando la selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformadas seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las

10 cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinado, transfectar las células hospedadoras, seleccionar las transformados, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos o

15 las porciones de los mismos que se unen a los antígeno de la invención pueden expresarse en un animal (*por ejemplo*, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase *por ejemplo*, Taylor, L.D., y cols. Nucl. Acids Res., 20: 6287-6295(1992)). Las células vegetales pueden modificarse también para crear plantas transgénicas que expresen el

20 anticuerpo o la porción del mismo que se une al antígeno, de la invención.

En vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones de ácidos nucleicos, vectores, y células hospedadoras que pueden usarse para la expresión recombinada de los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención. Preferiblemente, la invención destaca ácidos

25 nucleicos aislados que codifican las CDR de 4A5-3.1.1-B4, o la región variable

completa de la cadena pesada y/o ligera de 4A5-3.1.1-B4. En consecuencia, en una realización, la invención destaca un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que codifica la CDR3 de la cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo codifica además una CDR2 de la cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14. Más preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo codifica además una CDR1 de la cadena pesada de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10 (la región de HCVR completa de 4A5-3.1.1-B4).

En otras realizaciones, la invención destaca un ácido nucleico aislado que codifica un región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que codifica la CDR3 de la cadena ligera 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo codifica además una CDR1 de la cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (la región completa de LCVR de 4A5-3.1.1-B4).

En otras realizaciones, la invención destaca un ácido nucleico aislado

91/92

-29-

que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que codifica la CDR3 de la cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8 Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo
5 codifica además una CDR1 de la cadena ligera de 4A5-3.1.1-B4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. Incluso más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (la región completa de la LCVR de 4A5-3.1.1-B4).

10 En otra realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un dominio CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 (es decir, la CDR3 de la HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Este ácido nucleico puede codifica únicamente la región CDR3 o, más preferiblemente, codifica una región variable de la cadena
15 pesada (HCVR) completa del anticuerpo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una HCVR que tiene un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 (es decir, la CDR2 de la HCVR de 4A5-3.1.1-B4) y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SED ID N°: 12 (es decir, la CDR1 de la HCVR de 4A5-3.1.1-B4).

20 En otra realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (es decir, la LCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, aunque los expertos en la técnica
25 apreciarán que, debido a la degeneración del código genético, otras

secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. El ácido nucleico puede codificar únicamente la LCVR o puede codificar también una región constante de la cadena ligera de un anticuerpo, ligada operativamente a la LCVR. En una realización, este ácido nucleico está

5 en un vector de expresión recombinado.

En otra realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10 (es decir, la HCVR de 4A5-3.1.1-B4). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la

10 secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 9, aunque los expertos en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10. El ácido nucleico puede codificar únicamente la HCVR o puede codificar también una región constante de la cadena pesada, ligada

15 operativamente a la HCVR. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una región constante de la IgG1 o IgG4. En una realización, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinado.

Los expertos en la técnica son conscientes de que las modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden dar como resultado un

20 anticuerpo que presente características funcionales equivalentes o superiores cuando se comparan con el anticuerpo original. Las alteraciones en los anticuerpos de la presente invención pueden incluir una o más inserciones, deleciones, sustituciones, truncamientos, fusiones y similares de aminoácidos, ya sea debido a mutaciones naturales o a manipulación humana. La presente

25 invención comprende anticuerpos descritos en la presente memoria que

03
gh

comprenden además una o más sustituciones de aminoácidos con la condición de que los anticuerpos sustituidos tengan sustancialmente la(s) misma(s) (o mejorada(s) o reducida(s), según se desee) actividad(es) que los anticuerpos que se describen en la presente memoria. Preferiblemente, una CDR de la

5 presente invención tiene 3 o menos sustituciones conservadoras. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene 2 o menos sustituciones conservadoras. Preferiblemente, una CDR de la presente invención tiene una sustitución conservadora. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden prepararse anticuerpos que tienen sustituciones

10 conservadoras de aminoácidos mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse un número de procedimientos de mutagénesis, incluyendo ensamblado por PCR, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos Kunkel (dut-ung-) y tiofosfato (kit Amersham Sculptor). Las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 1 junto con las

15 sustituciones preferidas.

Tabla 1. Sustituciones conservadoras

Residuo	Sustituciones	Sustitución preferida
Ala (A)	gly, val, leu, ile, ser, met, thr	Val
Arg (R)	lys, gln, asn, his	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Ala, ile, leu, pro, ser, met, val val	Ala
His (H)	Asn, gln, lys, arg	Arg
Ile (I)	Leu, val, met, ala, phe, norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala phe	Ile
Lys (K)	Arg, gln, asn, his	Arg
Met (M)	Ala, gly, ile, leu, phe, ser, val	Leu
Phe (F)	Leu, val, ile, ala, trp, tyr	Tyr
Pro (P)		

QA

Ser (S)	Ala, gly, ile, leu, met, thr, val	Thr
Thr (T)	Ala, gly, ile, leu, met, ser, val	Ser
Trp (W)	tyr, phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	Phe
Val (V)	Ala, ile, leu, met, ser, met, norleu	Leu

La invención proporciona también vectores de expresión recombinados que codifican un anticuerpo que comprende un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 2, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 4, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 6, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 8, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 10, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 12, un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 14; y un polipéptido como se muestra en la SEQ ID N°: 16.

La invención proporciona también vectores de expresión recombinados que codifican tanto una cadena pesada de un anticuerpo como una cadena ligera de un anticuerpo. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinado que codifica:

- a) una cadena pesada de un anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10; y
- b) una cadena ligera de un anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2.

Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulinas de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio de iones, afinidad, fase inversa, en columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las

95
96

inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de, al menos, aproximadamente 90 a 95% y se prefieren más con una homogeneidad de 98 a 99% o superior, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta lograr la homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden
5 usarse después terapéuticamente o profilácticamente como se apunta en la presente memoria.

Los anticuerpos de la presente invención pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una
10 porción de un anticuerpo de la invención y un diluyente, vehículo, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas para su administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración, y se usan diluyentes, vehículos, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones,
15 tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares según sea apropiado

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano contra hTNFSF13b de la presente invención puede administrarse a un mamífero que presente riesgo o que exhiba síntomas relacionados con la
20 autoinmunidad o patologías tales como lupus eritematoso sistémico usando técnicas de administración estándar mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorio.

Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse en una
25 composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. Se

916
97

prefiere la administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para tales inyecciones son básicos. Además, sin embargo, la administración puede efectuarse también a través de las membranas mucosas mediante aerosoles nasales o supositorios. Las formulaciones adecuadas para tales modos de administración son notorias y típicamente incluyen tensioactivos que facilitan la transferencia a través de la membrana.

Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse por filtración después de preparar la formulación o, hacerse microbiológicamente aceptables por otros medios. Una composición típica para la infusión intravenosa podría tener un volumen de hasta 250 ml de fluido, tal como solución estéril de Ringer, y 1-100 mg por ml, o más de concentración de anticuerpos. Los agentes terapéuticos de la invención pueden congelarse todos o liofilizarse para almacenarse y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y reconstitución pueden provocar diversos grados de pérdida de actividad de los anticuerpos (por ejemplo con las globulinas inmunitarias convencionales, los anticuerpos de IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG). Puede ser que haya que ajustar las dosis para compensar. El pH de la formulación se seleccionará para equilibrar la estabilidad (química y física) de los anticuerpos y el bienestar del paciente cuando se administra. Generalmente se tolera un pH entre 6 y 8.

TNFSF13b juega un papel crítico en la patología asociada a una variedad de enfermedades que implican factores inmunitarios e inflamatorios.

97
98

Por lo tanto puede usarse una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano contra hTNFSF13b de la invención para tratar trastornos en los que la actividad de TNFSF13b sea perjudicial, por ejemplo enfermedades inmunitarias que incluyen enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Los trastornos preferidos incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de órganos trasplantados, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada al trasplante de órganos, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, parasitosis, infertilidad en la mujer, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren, y cánceres, en particular linfomas o mielomas de linfocitos B o T.

Más preferiblemente, se usa una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano contra hTNFSF13b y/o un fragmento de anticuerpo de la invención para tratar lupus eritematoso sistémico.

También se contempla en la presente memoria el uso de un anticuerpo humano contra hTNFSF13b de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial.

En ciertas situaciones, un anticuerpo de la invención se formulará conjuntamente y/o se administrará conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos que se usan en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. Tales politerapias pueden utilizar ventajosamente dosis

19
gh

menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias. Los expertos en la técnica apreciarán que cuando los anticuerpos de la invención se usan como parte de una politerapia, puede ser deseable una dosis menor
5 de anticuerpo que cuando se administra el anticuerpo solo a un sujeto (por ejemplo, puede lograrse un efecto terapéutico sinérgico mediante el uso de politerapia que, a su vez, permite el uso de una dosis menor del anticuerpo para lograr el efecto terapéutico deseado).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una
10 "cantidad terapéuticamente efectiva" o a "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores
15 tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales son superados por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva"
20 se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

25 Pueden ajustarse las posologías para proporcionar la respuesta óptima

93
+100

-37-

deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse diversas dosis divididas durante un tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

- 5 Dada su capacidad de unirse a hTNFSF13b, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar polipéptidos TNFSF13b (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como ensayos de inmunosorción ligados a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La invención
- 10 proporciona un procedimiento para detectar TNFSF13b en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar el anticuerpo (o porción del anticuerpo) unido a hTNFSF13b o anticuerpo (o porción del anticuerpo) no unido, para detectar de este modo hTNFSF13b en la muestra
- 15 biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa
- 20 alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferon, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinil-amina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritina; un ejemplo de un material
- 25 luminiscente incluye luminol; y ejemplos materiales radiactivos adecuados

incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H .

Como alternativa a marcar el anticuerpo, puede ensayarse TNFSF13b en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo utilizando patrones de TNFSF13b marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo humano no marcado contra hTNFSF13b. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de TNFSF13b marcados y el anticuerpo humano contra hTNFSF13b se combinan y se determina la cantidad de patrón de TNFSF13b marcado unido al anticuerpo. La cantidad de TNFSF13b en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rTNFSF13b marcado unido al anticuerpo humano contra hTNFSF13b.

En otra realización, la presente invención proporciona un uso de un anticuerpo que neutraliza la actividad de TNFSF13b uniéndose a un epítipo de TNFSF13b. El epítipo se identificó como se describe en el Ejemplo 10. Como referencia, la porción soluble de hTNFSF13b se representa como sigue:

15 TNFSF13b humana 1 AVQGPETVT QDCLQLIADS ETPTIQKGSY TFVPWLLSFK 40
41 RGSALLEKEN KILVKETGYF FIYGOVLYTD KTYAMGHLIQ 80
81 RKKVHVPGDE LSLVTLFRCI QNMPETLPMN SCYSAGIAKL 120
121 EEGDELQIAI PRENAQISLD GDVTFPGALK LL 152

20 Los aminoácidos hTNFSF13b implicados en la unión de los anticuerpos
humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden al menos uno de los
aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en: treonina en la
posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la
posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106,
25 leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización,
los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos

101 102

contra hTNFSF13b comprenden al menos dos de los aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden al menos tres de los aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden al menos cuatro de los aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, ácido glutámico en la posición 105, treonina en la posición 106, leucina en la posición 107, y asparagina en la posición 109.

En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105.

En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden ácido glutámico en la posición 105 y al menos uno de los aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: treonina en la posición 69, lisina en la

102
107

-40-

posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden treonina en la posición 106 y al menos uno de los aminoácidos que se selecciona del grupo que
5 consiste en: treonina en la posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden leucina en la posición 107 y al menos uno de los aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: treonina en la
10 posición 69, lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y tirosina en la posición 73. En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden asparagina en la posición 109 y al menos uno de los aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, y
15 tirosina en la posición 73.

En otra realización, los aminoácidos implicados en la unión de los anticuerpos humanos novedosos contra hTNFSF13b comprenden lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73, y ácido glutámico en la posición 105.

20 Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten la invención.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra hTNFSF13b

Se generaron anticuerpos monoclonales usando la tecnología HuMAb-
25 MouseTM en Medarex inmunizando los ratones con hTNFSF13b soluble

(aminoácidos 133–285, comprados en RDI, Flanders, NJ). Se usaron ratones HCo7 y HCo12. Se inmunizó a los ratones con 15 µg a 50 µg de hTNFSF13b soluble en RIBI, adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. A ocho ratones que mostraban valoraciones de anticuerpos en suero
5 contra hTNFSF13b se les inyectó i.v. 10 µg de hTNFSF13b en PBS. Se recolectó el bazo de cada ratón tres días después y se fusionó con células de mieloma de acuerdo con el procedimiento que se describe en Zola (Zola, H. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Boca Raton, FL. (1987)).

10 Se analizaron los hibridomas para determinar la unión a hTNFSF13b y para asegurarse de que expresaban las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana. Se detectó la unión del anticuerpo a hTNFSF13b mediante un ELISA de la forma siguiente:

Se recubrieron las placas con 50 µl de hTNFSF13b a 5 µg/ml en PBS
15 toda la noche a 4°C. Después se vaciaron las placas y se bloquearon con 100 µl de PBS + Tween 20 al 0,05% (PBST) + suero de pollo al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBST, se escurrieron las placas y se añadieron 100 µl de reactivos secundarios diluidos (HRP-HuIgGFc, Jackson nº de cat. 109-036-098 o HRP-HuKappa, Bethyl nº de
20 cat. A80-115P; 1: 5000 en tampón de bloqueo) por pocillo. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces las placas como se describe anteriormente. Se revelaron las placas usando 10 ml de tampón de citrato y fosfato a pH 4,0, 80 µl de ABTS, 8 µl de H₂O₂ por placa. Después de
25 incubación durante 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de las placas A415-A490. Los hibridomas que demostraron que

10A
10S

-42-

se unían a hTNFSF13b y que eran la cadena pesada de huIgG y la cadena ligera kappa humana se seleccionaron para subclonar.

El medio de cultivo celular de hibridomas subclonados se concentró en sistemas de filtración tangenciales Amicon ProFlux M12 usando membranas Amicon S3Y30 UF. El medio concentrado se pasó por columnas de proteína A sefarosa (columna de 5 a 20 ml) con una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las columnas se lavaron con tampón A (PBS, a pH 7,4) hasta que la absorbancia volvió a los niveles iniciales y los polipéptidos unidos se eluyeron con ácido cítrico 50 mM, a pH 3,2. Inmediatamente se neutralizaron las fracciones con Tris 1 M, a pH 8,0. Después se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE. Se juntaron las fracciones que contenían anticuerpo y se concentraron usando una unidad de filtrado por centrifugado Ultrafree (Millipore, con corte en peso molecular de 10 kDa).

Ejemplo 2: Actividad funcional de anticuerpos humanos contra hTNFSF13b

Se midió la actividad neutralizadora de los anticuerpos humanos de la invención contra hTNFSF13b usando una línea de linfocitos B dependiente de IL-1 murina. Las células se lavaron tres veces con medio de ensayo (RPMI1640 que contenía FBS al 10%, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y penicilina, estreptomicina y fungizona) para eliminar IL-1. Se resuspendieron las células a 100.000 células/ml en medio de ensayo que contenía 2,5 ng/ml de huTNFSF13b soluble y se plaquearon a 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubó a 37°C en CO₂ al 5%. Se incluyeron los sobrenadantes de hibridomas con ELISA positivos con una dilución de 1:4. Cuarenta y ocho horas después se añadieron 20 µl de solución Promega CellTiter 96 Aqueous

105
106

-43-

One (Madison, WI) y la placa se incubó durante 5 horas más a 37°C en CO₂ al 5%. Para medir la proliferación, se leyó la absorbancia a A490. Un ejemplo de actividad de neutralización para uno de los sobrenadantes de los hibridomas, 4A5-3.1.1-B4, se muestra en la Figura 1. Como control se añadieron los anticuerpos a células estimuladas con IL-1. No se observaron indicios de inhibición de la proliferación estimulada por IL-1, únicamente de la proliferación estimulada por hTNFSF13b.

Se analizaron los anticuerpos neutralizadores para determinar su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos B humanos primarios aumentada por TNFSF13b en respuesta a estimulación contra IgM. Los linfocitos B humanos primarios se aislaron de sangre humana usando selección positiva de CD19 usando el sistema de aislamiento magnético MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se añadieron los linfocitos B a los pocillos de una placa de 96 pocillos a 2×10^5 células por pocillo en RPMI completo que contenía FCS al 10% (RPMI completo es RPMI1640 que contiene L-glutamina 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 M, y β-mercaptoetanol 1×10^{-5} M). Algunos de los pocillos se recubrieron con 10 µg/ml de IgM contra humano en PBS (BD PharMingen, Clone G20-127), hasta la mañana siguiente a 4°C y se lavaron cuatro veces con PBS antes de usarse. Algunas de las células se estimularon con hTNFSF13b soluble (25 ng/ml) en presencia o ausencia de anticuerpo neutralizador contra hTNFSF13b (2,5 µg/ml). La Figura 2 ilustra la capacidad de 4A5-3.1.1-B4 de neutralizar el efecto estimulador de hTNFSF13b.

25 Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos monoclonales

100
102

Todos los anticuerpos neutralizadores contra hTNFSF13b eran IgG1 humana o IgG4 humana. Se ensayaron también para determinar su capacidad de unirse a hTNFSF13b en un estado desnaturalizado, es decir, hTNFSF13b separada en SDS-PAGE y transferida en nitrocelulosa. Todos los anticuerpos
5 neutralizadores fracasaron en unirse a hTNFSF13b en una transferencia Western aunque algunos de los anticuerpos no neutralizadores lo lograron.

Se realizaron experimentos que utilizaban el sistema BIACore para determinar si los anticuerpos no neutralizadores y los anticuerpos neutralizadores se unían al mismo sitio de hTNFSF13b. Primero, se recubrió
10 una pastilla con 4A5-3.1.1-B4 seguido de inyección de hTNFSF13b y después una cantidad saturada de anticuerpo no neutralizador. Una vez se ha logrado la saturación, se pasó una concentración elevada de 4A5-3.1.1-B4 sobre la pastilla. Once de los anticuerpos monoclonales no neutralizadores fueron incapaces de competir por el mismo sitio de unión que 4A5-3.1.1-B4. Uno de
15 los hibridomas no neutralizador fue capaz de bloquear la unión de 4A5-3.1.1-B4 en aproximadamente 45%, lo que indicaba que puede tener un epítipo cerca del epítipo de 4A5-3.1.1-B4.

Usando el mismo diseño experimental, se determinó también que el mAb neutralizador, 4A5-3.1.1-B4, podría competir por el mismo sitio de unión
20 que uno de los receptores de hTNFSF13b, TACI. Estos experimentos sugieren que TACI-Fc y 4A5-3.1.1-B4 pueden tener epítopos traslapados en hTNFSF13b.

Se inmovilizó 4A5-3.1.1-B4 sobre una fase sólida pasando la solución de anticuerpos sobre una resina IMAC cargada con Co^{+2} . Después de la unión,
25 el cobalto se oxidó al estado +3 incubando la resina con una solución de

107
108

-45-

peróxido diluida. Después de lavar la resina, se pasaron por la columna hTNFSF13b natural y hTNFSF13b que estaba modificada (mediante reducción/alquilación o desnaturalización térmica). Después de lavar, la proteína unida se eluyó con una solución ácida y las proteínas eluidas se
5 analizaron mediante EM MALDI. 4A5-3.1.1-B4 se unió a hTNFSF13b natural recombinada, pero no se unió a hTNFSF13b química o térmicamente modificadas. Por lo tanto, el 4A5-3.1.1-B4 parece reconocer un epítipo adaptativo en hTNFSF13b soluble.

Se incubó hTNFSF13b soluble recombinada (RDI) con 4A5-3.1.1-B4 o
10 anticuerpo policlonal de conejo contra TNFSF13b (MoBiTec, Marco Island, FL; contra los aminoácidos 254 a 269 de hTNFSF13b) sobre hielo durante 2 horas y la mezcla de proteínas se aplicó a una HPLC de exclusión por tamaño (dos columnas en tandem TosoHaas TSK-GEL G3000PW) equilibradas en PBS con un caudal de 0,25 ml/minuto. Las proteínas se eluyeron con PBS. Como
15 controles, se analizaron por separado soluciones de anticuerpos y la solución de hTNFSF13b. TNFSF13b humana eluyó de la columna de exclusión por tamaño en una posición consistente con un trímero de moléculas de TNFSF13b. La elución de trímero de hTNFSF13b se adelantó en presencia de 4A5-3.1.1-B4 pero no en presencia de anticuerpos policlonales TNFSF13b lo
20 que indica la unión de trímero de hTNFSF13b al anticuerpo 4A5-3.1.1-B4. Estos datos sugieren que el mAb neutralizador 4A5-3.1.1-B4 se une a un epítipo adaptativo en hTNFSF13b.

Ejemplo 4: Medición de la afinidad de anticuerpos monoclonales mediante BIAcore

25 Se midió la afinidad de diversos anticuerpos humanos contra

100
100

hTNFSF13b por hTNFSF13b usando un sistema de instrumentos BIAcore 2000. El sistema utiliza las propiedades ópticas de la resonancia de plasma superficial para detectar la alteración de la concentración proteínica de moléculas que interactúan en una matriz de biosensores de dextrano. Excepto
5 donde se indique lo contrario, todos los reactivos y materiales se compraron en BIAcore AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se realizaron a 25°C. Las muestras se disolvieron en tampón HBS-EP (NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 al 0,005% (w/v), y HEPES 10 mM, a pH 7.4). Se inmovilizó IgG de cabra contra ratón (Fc específico; Jackson ImmunoResearch, West Grove,
10 PA) en la cubeta de flujo 1 sobre una pastilla de sensor CM5 usando el kit de acoplamiento de aminas. También se inmovilizó IgG de cabra contra humano (Fc específico; Jackson ImmunoResearch) en la cubeta de flujo 2 también mediante acoplamiento de aminas. Ambos anticuerpos se inmovilizaron para alcanzar 700 unidades de respuesta cada una.

15 Se evaluó la unión de hTNFSF13b recombinada (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ) usando múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realizó con un caudal de 30 µl/minuto y consistía en las siguientes etapas: inyección de 150 µl de 4A5-3.1.1-B4 a 20 µg/ml, inyección de 250 µl de hTNFSF13b (comenzando por 50 nM y usando diluciones seriadas de orden 2 para cada
20 ciclo) seguido de 15 minutos de disociación y regeneración usando 90 µl de glicina HCl 10 mM, pH 1.5.

Las velocidades de asociación y disociación para cada ciclo se evaluaron usando un modelo de unión Langmuir 1:1 en el programa BIAevaluation. Se determinó que la K_D de 4A5-3.1.1-B4 por hTNFSF13b era 38
25 pM.

10/1/00

Ejemplo 5: Clonación y secuenciación de las cadenas pesada y ligera de las regiones de unión a antígenos

Se clonaron y secuenciaron las regiones variables de la cadena pesada y ligera para el mAb neutralizador humano 4A5-3.1.1-B4 usando los siguientes
5 protocolos.

Se preparó ARNm a partir de 2×10^6 hibridomas usando el protocolo Micro-Fast Track (Invitrogen) que se proporciona con el kit. Se preparó ADNc a partir de 200 μ l de precipitado de etanol de ARNm usando el Kit ADNc Cycle (Invitrogen) centrifugando la alícuota de ARNm durante 30 minutos a 14.000
10 rpm a 4°C seguido de lavado del sedimento con etanol al 70%. El sedimento desecado al aire se resuspendió en 11,5 μ l de agua estéril y se preparó ADNc siguiendo las instrucciones del kit. Se omitió la segunda tanda opcional de síntesis de ADNc pero se limpió el ADNc usando la etapa de extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol. El sedimento de ADNc se
15 resuspendió en 30 μ l de TE para usarse en la PCR.

Las reacciones de la PCR se prepararon con cebadores degenerados en el extremo 5' de la región variable para la cadena pesada y ligera pareados con cebadores 3' en la región constante. Para cada reacción de 50 μ l, se usó 1 μ l de ADNc. La reacción se preparó según las instrucciones de uso con PfuI
20 seguido de 20 ciclos. Los productos de la PCR se comprobaron analizando 5 μ l de cada reacción en un gel de agarosa al 1%. Las reacciones positivas se clonaron usando el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen). Se secuenciaron las minipreparaciones de los clones positivos y se analizaron para determinar las reconfiguraciones de genes productivas. Los resultados de
25 las reacciones de PCR y la secuenciación de los múltiples clones revelaron las

110
/

secuencias que se describen a continuación.

Secuencias de la cadena ligera del anticuerpo 4A5-3.1.1-B4 humano (las CDR están en negrita).

5 E · I V L T Q S P A T L S L S P G E
1 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA
CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCGGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT

CDR1

10

 R · A T L S C R A S Q S V S R Y L
51 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC CGCTACTTAG
TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCAGT CTCACAATCG GCGATGAATC

15

 A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D
101 CCTGGTACCA GCAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT
GGACCATGGT CGTCTTTGGA CCGGTCCGAG GGTCCGAGGA GTAGATACTA

20

CDR2

 A · S N R A T G I P A R F S G S G S
151 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC
25 CGTAGGTTGT CCCGGTGACC GTAGGGTCGG TCCAAGTCAC CGTCACCCAG

30

 G T D S T L T I S S L E P E D F
201 TGGGACAGAC TCCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG
ACCCTGTCTG AGGTGAGAGT GGTAGTCGTC GGATCTCGGA CTTCTAAAAC

111/12/74

CDR3

A V Y Y C Q Q R S N W P R T F G Q
5 251 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GTCAAATAAT GACAGTCGTC GCATCGTTGA CCGGAGCCTG CAAGCCGGTT
Ck
G T K V E I K R T V A A P S V F I
10 301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT
CCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCTTGACAC CGACGTGGTA GACAGAACTA
F P
15 351 CTTCCCG
GAAGGGC

Secuencias de la cadena pesada del anticuerpo 4A5-3 1 1-B4 humano (las CDR están en negrita, la secuencia de señal está en cursiva)

20

H K H L N P P L L L V A A P R W V
1 ATGAAACACC TGTGTTCTT CCTCCTCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

25

L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P
51 CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCCTCCTGAC AACTTCGGAA

30

112/13

S E T L S L T C A V Y Q G S F S G
101 CCGAGACCCCT GTCCTCACC TCGCTGTCT ATGTTGGTC CTCAGTGGT
GCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA

5 CDR1

Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I
151 TACTACTGGA GCTGATCCG CCAGCCCCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGAT
ATGATGACCT CGACCTAGGC GGTGGGGGT CCCTTCCCCG ACCTCACCTA

10 CDR2

G E I W H S G S T N Y N P S L K
201 TGGGAAATC AATCATAGTG GAAGCACCAA CTACAACCCG TCCCTCAAGA
15 ACCCTTTAG TTAGTATCAC CTCGTGGTT GATGTTGGGC AGGGAGTTCT

S R V T I S V D T S K N Q F S L K
251 GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAA
20 CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTCAAGT TCTTGTCAA GAGGGACTTT

L S S V T A A D T A V Y Y C A R G
301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGCGAGAGG
25 GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CACATAATGA CACGCTCTCC

CDR3

Y Y D I L T Q Y Y Y Y F D Y W G
30 351 GTATTACGAT ATTTGACTG GTTATTATTA CTACTTTGAC TACTGGGGCC

113
1121

CATAATGCTA TAAACTGAC CAATAATAAT GATGAACTG ATGACCCCG

Cy1

5 Q G T L V T V S S A S T K G P S V
401 AGGGAACCTT GGTACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC
TCCCTTGGGA CCACTGGCAG AAGAGTCGGA GGTGGTTCCC GGTAGCCAG

10 F P L A
451 TTCCCCCTGG CA
AAGGGGACC GT

**Ejemplo 6 Reactividad cruzada entre especies de anticuerpos humanos
15 contra hTNFSF13b con TNFSF13b no humano**

Para determinar la reactividad cruzada entre especies de los mAb
neutralizadores, se preparó un ELISA utilizando 4A5-3 1 1-B4 como mAb de
captura y de detección. Se usó TNFSF13b recombinada humana como curva
patrón. Podía detectarse TNFSF13b humana en el sobrenadante del cultivo de
20 células CHO transfectadas con un vector que expresaba hTNFSF13b en los
sobrenadantes de los monocitos humanos cultivados o suero o plasma
humano. Los sobrenadantes de las células CHO que expresaban TNFSF13b
murina se analizaron para determinar la reactividad en ELISA y dieron
negativo. También 4A5-3 1 1-B4 fue incapaz de inmunoprecipitar TNFSF13b
25 murina, pero fue capaz de inmunoprecipitar TNFSF13b humana. Se usó
TNFSF13b murina en el ensayo de proliferación que se describe en el Ejemplo
2. Usando este ensayo de proliferación 4A5-3 1 1-B4 fue incapaz de

1A
7/5

neutralizar la proliferación inducida por TNFSF13b murina. Esto indica que 4A5-3 1 1-B4 es incapaz de reconocer TNFSF13b murina.

Ejemplo 7 Secuencia de los aminoácidos de la cadena pesada de 4A5-3 1 1-B4

5 A continuación se incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 4A5-3 1 1-B4 que comprende la HCVR y la región constante de IgG4. La región constante de la IgG4 humana tiene una serina en la posición 231. Sin embargo, en esta posición 231 se sustituyó una serina por una prolina que introduce un cambio estructural en la región de bisagra para
10 obtener unos puentes disulfuro óptimos entre las cadenas. Esto reduce la generación de medios anticuerpos. Los medios anticuerpos están formados por una cadena pesada y una cadena ligera.

1 QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSPS GYYHSHIRQP PGKGLEWIGE
51 INHSGSTNYN PELKSRVTIS VDTSTNQPSL KLSSTAAADT AVYYCARGYY
15 101 DILTGYYYYP DYWGQGTLLV TSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
151 LVKDYPPEPV TVSWNSGALT SGVHTPPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201 TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLOG PSVFLPPPKP
251 KDTLMISRTP EYTCVVVDVS QEDPEVQFNM YVDGVEVHNA KTKPREBQFN
301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIETKIS KAKQPREPQ
20 351 VYTLPPSQEE MTNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
401 LDSDGSPFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNYHT QKSLSLSLGK (SEQ ID
N°: 17)

Además, puede hacerse una sustitución de alanina por fenilalanina en la posición 237 y una sustitución de alanina o ácido glutámico por leucina en la
25 posición 238 para reducir la función efectora del anticuerpo.

Ejemplo 8 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 4A5-3 1 1-

115
-16

B4

A continuación se incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 4A5-3 1 1-B4 que comprende la HCVR y la región constante de IgG1

5

1 QVQLQQMGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSPS GYYMSWIRQP POKOLEWIGZ
51 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQPSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 DILTGYYYYP DYNOQGTLLVT VSSASTKOPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLES VVTVPSSSLG
10 201 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LOGPSVFLFP
251 PKPKDTLNIH RTPEVTCVVV DVSHEDEPKV PMWYVDGVEV HNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPS RDELTONQVS LTCLVKGPYP SDIAVEWESN QOPENNYKTT
401 PPVLDSGGSP FLYSKLTVDK SRNQGGNVPS CSVMHEALHN HYTKSLSLG
15 451 PGK (SEQ ID N°: 18)

Ejemplo 9 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 4A5-3 1 1-B4

A continuación se incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 4A5-3 1 1-B4 que comprende la LCVR y la región constante kappa

20

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP QQAPRLLIYD
51 ASNRTATGIPA RFSQSGSGTD STLTISSELEP EDFAVYYCQQ RSMMPRTPOQ
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQMKV
25 151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSENTLT LSKADYEIKH VYACEVTHQG
201 LSSPVTKSPW RGEC (SEQ ID N°: 19)

Ejemplo 10 Identificación del epítopo para 4A5-3 1 1-B4

116
1/17

Se determinó el epítipo al que une 4A5-3 1 1-B4 y TNFSF13b humana neutralizada. Las secuencias de TNFSF13b humana y murina se alinean como se muestra a continuación

5 TNFSF13b murina 1 APOGPEETEQ DVDLSAPPAP CLPGCRHSDH DONGMILANI IQDCIQLIA 49
TNFSF13b humana 1 AVQGPEE- - - - - - - - - - -TV IQDCIQLIA 18

TNFSF13b murina 50 DSDTPTIRKG TYTFVPLLK FKRGNALEEK ENKIVVRQTG YFFIYSQVLY 99
TNFSF13b humana 19 DSETPTIQKG SYTFVPLLK FKRGSALEEK ENKILVKETG YFFIYQOVLY 68

10 TNFSF13b murina 100 TDPIFAMGHV IQRKKVHVFG DELSLVTLFR CIGMMPKTLF NNSCYSAGIA 149
TNFSF13 humana 69 TDKTYAMGHL IQRKKVHVFG DELSLVTLFR CIGMMPETLP NNSCYSAGIA 118

TNFSF13b murina 150 RLEEGDEIQL AIPRENAQIS RNQDDTFPGA LKLL 183
15 TNFSF13b humana 119 KLEEGDELQL AIPRENAQIS LGGDVTFPGA LKLL 152

Se creó un modelo de homología para TNFSF13b humana basándose en la estructura cristalina conocida para varios miembros de la familia de TNF

20 Los residuos expuestos que son diferentes entre las TNFSF13b murina y humana son sitios de unión potenciales para 4A5-3 1 1-B4 dado que 4A5-3 1 1-B4 neutraliza TNFSF13b humana pero no la murina

Se identificaron tres epítopos potenciales 1) K71, T72 Y73, E105, 2) Q26 S29, L139, D140, y 3) L53, K55, E56, K119. Se realizó una mutagénesis para formar moléculas quiméricas cambiando la secuencia de aminoácidos de la humana a la murina. La Quimera A era L139R, D140N la Quimera B era K71P T72I Y73F la Quimera C era K71P T72I, Y73F, E105K, la Quimera D era L53V, K55R, E56Q la Quimera E era E105K

117-115

Usando el ensayo de proliferación como se describe en el Ejemplo 2 se analizaron todas las quimeras para determinar la actividad funcional y la neutralización por 4A5-3 1 1-B4. Se realizaron ensayos iniciales usando los sobrenadantes de 293 transfecciones transitorias para cada una de las quimeras y ambas moléculas parentales TNFSF13b humana y TNFSF13b murina. Todas las quimeras indujeron una proliferación similar lo que indica que las quimeras producidas eran funcionales. Usando 6 ng/ml de 4A5-3 1 1-B4, se observó una neutralización del 100% con TNFSF13b humana y con las quimeras A, B, D y E. No se observó neutralización para TNFSF13b murina ni para la quimera C. Se produjeron mutantes de TNFSF13b purificados para las quimeras A, B, y C y se repitió el ensayo usando 11 ng/ml de cada uno de TNFSF13b parental o TNFSF13b quimera y 1 µg/ml de 4A5-3 1 1-B4. Los resultados demostraron que se observaba una neutralización del 100% con TNFSF13b humana y con la quimera A, una neutralización del 88% con la quimera B y no se observó neutralización para TNFSF13b murina o para la quimera C.

Ejemplo 11 Estudios in vivo usando 4A5-3 1 1-B4

Se generan ratones transgénicos que sobreexpresan TNFSF13b usando técnicas establecidas como describen Hogan, B. y cols. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, NY] modificado por Fox y Solter (Mol. Cell Biol. 8: 5470, 1988). Brevemente, se microinyecta un fragmento de ADN que comprende el gen hTNFSF13b en el pronúcleo masculino de embriones en la etapa unicelular recientemente fertilizados (zigotos) de la cepa FVB/N. Se cultivan los embriones in vitro toda la noche para permitir el desarrollo de la etapa de dos células. Después se

110-119

trasplantan los embriones bicelulares a oviductos de ratones de la cepa CD-1 pseudopreñadas para permitir su desarrollo a término. Para analizar la presencia del transgen en el ratón recién nacido, se corta una pequeña parte de un dedo de cada animal y se digiere con proteinasa K para liberar los ácidos nucleicos. Subsiguientemente se somete una muestra de extracto de dedo a análisis por PCR para identificar los ratones que contienen transgenes.

Los ratones transgénicos para hTNFSF13b mostraron un aumento espectacular de los linfocitos B periféricos, generalmente aproximadamente tres veces comparados con ratones de la misma camada de la misma edad y sexo. También hubo un pequeño aumento de los linfocitos T periféricos. Los ratones transgénicos para hTNFSF13b se trataron con 4A5-3 1 1-B4 para determinar si la neutralización de hTNFSF13b daría como resultado una reducción de los números de linfocitos B hasta números normales. A las 15 semanas de edad, se inyectó subcutáneamente 25 μ g de 4A5-3 1 1-B4 o anticuerpo isotipo de control a ratones hTNFSF13b hembra dos veces a la semana durante tres semanas. Cuatro días después de la última inyección de anticuerpo, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazo para ser analizados. Se calcularon los números de linfocitos B y T determinando el porcentaje de células CD19+ para los linfocitos B, y células CD3+, para los linfocitos T usando citometría de flujo y recuento de leucocitos totales para cada bazo. Los resultados que se muestran a continuación demuestran que la administración in vivo de 4A5-3 1 1-B4 a ratones transgénicos para hTNFSF13b es capaz de restablecer los números normales de linfocitos T y B (media $\pm$ desviación típica).

119
170

	linfocitos B (x10 ⁶)	linfocitos T (x10 ⁶)
Grupo de tratamiento		
Compañeros de camada de tipo silvestre	29 ± 11	46 ± 15
Transgénicos + mAb isotipo	122 ± 30	75 ± 14
Transgénicos + mAb 4A5	29 ± 5	46 ± 12

Secuencias de la presente invención:

SEQ ID N° 1 → secuencia de polinucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera

5

GAAATTGTGTTGACGCACTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACT
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGG
10 GTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT

SEQ ID N° 2 → secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera

15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLANYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTD
STLTISSELEPEDFAVYYCQGRSNWPRTFGQGTKEIKRT

20 SEQ ID N° 3 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR1 de la cadena ligera

AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCC

25 SEQ ID N° 4 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR1 de la cadena ligera

RASQSVSRYLA

30 SEQ ID N° 5 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR2 de la

12/12

cadena ligera

GATGCATCCAACAGGGCCACT

- 5 SEQ ID N°: 6 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR2 de la cadena ligera

DASNRAT

- 10 SEQ ID N° 7 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR3 de la cadena ligera

CAGCAGCGTAGCAACTGQCCTCGGACG

- 15 SEQ ID N° 8 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR3 de la cadena ligera

QQRSNWPRT

- 20 SEQ ID N°: 9 → secuencia de polinucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada

ATGAAA

CACCTGTGGTTCCTCCTCCTGGTGCCAGCTCCCAGATGGGTCTGTC

- 25 CCAGGTGCAACTACAGCACTGGGGCCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA
CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTAC
TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGA
AATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCGTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGC
30 TCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTA

122-123

-60-

CGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID N° 10 → secuencia de aminoácidos que codifica la región
5 variable de la cadena pesada

NKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQWAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGET
NHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYPDYWGQGTLLTV
SS

10

SEQ ID N° 11 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR1 de
la cadena pesada

GGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGC

15

SEQ ID N° 12 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR1 de la
cadena pesada

GGSFSGYYWS

20

SEQ ID N° 13 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR2 de
la cadena pesada

GAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGT

25

SEQ ID N° 14 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR2 de la
cadena pesada

EINHSGSTNYPNPSLKS

30

123
-24

-61-

SEQ ID N° 15 → secuencia de polinucleótidos que codifica la CDR3 de la cadena pesada

GGGTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTAC

5

SEQ ID N°: 16 → secuencia de aminoácidos que codifica la CDR3 de la cadena pesada

GYDILTGYYYFDY

10

124
125

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1 Un anticuerpo humano contra hTNFSF13b que comprende al menos tres secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en

- a SEQ ID N° 4 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (LCVR),
- 10 b SEQ ID N° 6 localizada en la CDR2 de la LCVR,
- c SEQ ID N° 8 localizada en la CDR3 de la LCVR,
- d SEQ ID N° 12 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (HCVR),
- e SEQ ID N° 14 localizada en la CDR2 de la HCVR, y
- 15 f SEQ ID N° 16 localizada en la CDR3 de la HCVR

2 El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende al menos cuatro secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en

- a SEQ ID N° 4 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (LCVR)
 - 20 b SEQ ID N° 6 localizada en la CDR2 de la LCVR,
 - c SEQ ID N° 8 localizada en la CDR3 de la LCVR,
 - d SEQ ID N° 12 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (HCVR),
 - 25 e SEQ ID N° 14 localizada en la CDR2 de la HCVR y
-

f SEQ ID N° 16 localizada en la CDR3 de la HCVR

3 El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende al menos cinco secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en

- 5 a SEQ ID N° 4 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (LCVR),
- b SEQ ID N° 6 localizada en la CDR2 de la LCVR,
- c SEQ ID N° 8 localizada en la CDR3 de la LCVR,
- 10 d SEQ ID N° 12 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (HCVR);
- e SEQ ID N° 14 localizada en la CDR2 de la HCVR, y
- f SEQ ID N° 16 localizada en la CDR3 de la HCVR

4 El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende las secuencias

- 15 a. SEQ ID N° 4 localizada en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (LCVR),
- b SEQ ID N° 6 localizada en la CDR2 de la LCVR,
- c. SEQ ID N° 8 localizada en la CDR3 de la LCVR,
- d SEQ ID N° 12 localizada en la CDR1 de la región variable de la
- 20 cadena pesada (HCVR),
- e SEQ ID N° 14 localizada en la CDR2 de la HCVR, y
- f SEQ ID N° 16 localizada en la CDR3 de la HCVR

5 Un anticuerpo humano contra hTNFSF13b que comprende un

25 polipéptido de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se muestra

126/128

-64-

en la SEQ ID N° 2 o un polipéptido de la región variable de la cadena pesada (HCVR) como se muestra en la SEQ ID N° 10

6 El anticuerpo de la reivindicación 5 que comprende el polipéptido de la
5 LCVR como se muestra en la SEQ ID N° 2 y el polipéptido de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N° 10

7 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que
el anticuerpo se disocia de un polipéptido TNFSF13b con una K_D de 1×10^{-8} M
10 o menor

8 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que
el anticuerpo tiene una constante K_{off} de velocidad de disociación de 5×10^{-4}
s⁻¹ o menor
15

9 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que
el anticuerpo tiene una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menor

10 El anticuerpo de la reivindicación 9 en el que el anticuerpo tiene una CI_{50}
20 de 1×10^{-9} M o menor

11 El anticuerpo de la reivindicación 10 en el que el anticuerpo tiene una
 CI_{50} de 1×10^{-10} M o menor

25 12 El anticuerpo de la reivindicación 11 en el que el anticuerpo tiene una

127
128

-65-

Cl_{50} de 1×10^{-11} M o menor

13 Un anticuerpo humano contra hTNFSF13b con las siguientes características

5 a una constante K_{off} de velocidad de disociación de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor;

b un polipéptido con la secuencia de la SEQ ID N° 8 localizada en la CDR3 de la LCVR y

10 c un polipéptido con la secuencia de la SEQ ID N° 16 localizada en la CDR3 de la HCVR

14 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende una región constante de la cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgE e IgD

15

15 El anticuerpo de la reivindicación 14 en el que la región constante de la cadena pesada es IgG1 o IgG4

16 El anticuerpo de la reivindicación 15 en el que la región constante de la
20 cadena pesada es IgG4

17 El anticuerpo de la reivindicación 16 en el que la IgG4 tiene una prolina que sustituye a serina en la posición 231

25 18 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 que

120
129

comprende una región constante de la cadena ligera kappa o lambda

19 El anticuerpo de la reivindicación 18 que comprende una región constante de la cadena ligera kappa

5

20 El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en el que una CDR tiene tres o menos sustituciones conservadoras de aminoácidos

21 El anticuerpo de la reivindicación 20 en el que una CDR tiene dos o
10 menos sustituciones conservadoras de aminoácidos

22 El anticuerpo de la reivindicación 21 en el que una CDR tiene una sustitución de aminoácidos conservadora

15 23 Un anticuerpo humano contra hTNFSF13b que comprende una cadena ligera que comprende un polipéptido de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N° 2 y una región constante kappa y una cadena pesada que comprende el polipéptido de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N° 10 y una región constante de IgG4 con una prolina que sustituye a serina en la posición 231

20

24 Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 23

25 Un vector de expresión recombinado que codifica un anticuerpo de una
25 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23

129
130

26 A composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-23

5 27 La composición farmacéutica de la reivindicación 26 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable

28 Un procedimiento para inhibir la actividad de TNFSF13b en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial que
10 comprende la administración del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23

29 El procedimiento de la reivindicación 28 en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, artritis
15 reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa enfermedad inflamatoria del intestino, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada al trasplante de órganos, rechazo de órganos trasplantados, enfermedad de injerto contra huésped, sarcoidosis, enfermedades infecciosas, parasitosis,
20 infertilidad en la mujer, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren, y cáncer

30 El procedimiento de la reivindicación 29 en el que el trastorno es cáncer

25 31 El procedimiento de la reivindicación 29 en el que el trastorno es

130
131

rechazo de órganos trasplantados o enfermedad de injerto contra huésped

32 El procedimiento de la reivindicación 29 en el que el trastorno es lupus eritematoso sistémico

5

33 Un uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en la fabricación de un medicamento para la administración a un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial

10 34 El uso de la reivindicación 33 en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en lupus entematoso sistémico artritis reumatoide, artritis crónica juvenil artritis de Lyme, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, asma enfermedades alérgicas psoriasis enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada al transplante de
15 órganos rechazo de órganos trasplantados, enfermedad de injerto contra huésped, sarcoidosis, enfermedades infecciosas parasitosis infertilidad en la mujer, trombocitopenia autoinmunitana, enfermedad tiroidea autoinmunitaria enfermedad de Hashimoto, síndrome de Sjogren, y cáncer

20 35 El uso de la reivindicación 34 en el que el trastorno es rechazo de órganos trasplantados o enfermedad de injerto contra huésped

36 El uso de la reivindicación 36 en el que el trastorno es cáncer

25 37 El uso de la reivindicación 36 en el que el trastorno es lupus eritematoso

131
132

sistémico

- 38 Un uso de un anticuerpo que neutraliza la actividad de TNFSF13b uniéndose a un epítipo de TNFSF13b, en el que el epítipo comprende lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73 y ácido glutámico en la posición 105 en la fabricación de un medicamento para la administración a un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial
- 10 39 Un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y un anticuerpo contenido dentro de dicho material de envasado en el que el anticuerpo neutraliza la actividad de TNFSF13b para el tratamiento o prevención de que un sujeto humano padezca un trastorno en el que la actividad de TNFSF13b es perjudicial y en el que el material de envasado comprende un prospecto que indica que el anticuerpo neutraliza uniéndose a un epítipo de TNFSF13b, en el que el epítipo comprende lisina en la posición 71, treonina en la posición 72, tirosina en la posición 73 y ácido glutámico en la posición 105
- 20 40 El artículo de fabricación de la reivindicación 39, en el que el anticuerpo es cualquiera de las reivindicaciones 1-23
- 41 El artículo de fabricación de la reivindicación 40 en el que el anticuerpo comprende el polipéptido de la LCVR como se muestra en la SEQ ID N° 2 y el polipéptido de la HCVR como se muestra en la SEQ ID N° 10
- 25
-

132-97
-171

-70-

42 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende la SEQ ID N°
17

5 43 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende la SEQ ID N°
18

44 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende la SEQ ID N°
19

10

45 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende la SEQ ID N°
17 y la SEQ ID N° 19

46 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende la SEQ ID N°
15 18 y la SEQ ID N° 19

47 Un anticuerpo o un fragmento del mismo que inhibe competitivamente la
unión específica a hTNFSF13b del anticuerpo 4A5-3 1 1-B4 producido por el
hibridoma con Numero de Depósito en ATCC PTA- 3674

20

133
134

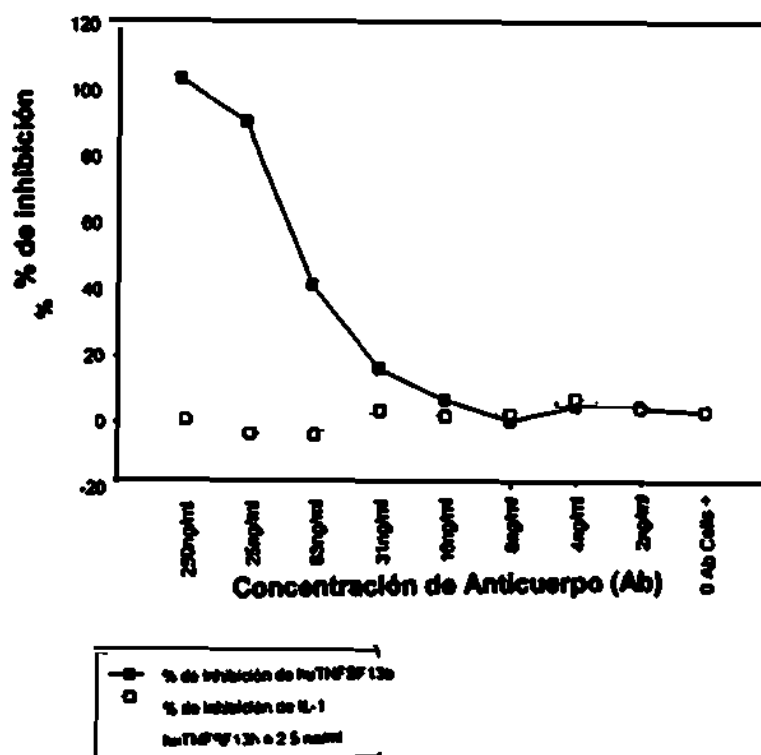
RESUMEN

Se describen anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a polipéptidos TNFSF13b. Estos anticuerpos presentan
5 afinidad elevada por hTNFSF13b (por ejemplo, $K_D = 10^{-8}$ M o menor) una lenta
velocidad de disociación de TNFSF13b (por ejemplo, $K_{off} = 10^{-3}$ s⁻¹ o menor) y
neutralizan la actividad de TNFSF13b *in vitro* e *in vivo*. Los anticuerpos de la
invención son de utilidad en una realización para inhibir la actividad de
TNFSF13b en un sujeto humano que padece un trastorno en el que la
10 actividad de hTNFSF13b es perjudicial. También están comprendidos en la
invención los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente
invención así como los vectores y células hospedadoras para su expresión.

Fig. 1/2

% de inhibición de la proliferación por huTNFSF13b
e IL-1 mediante 4A5-3.1 1-B4
 $IC_{50} = 76 \text{ ng/ml}$

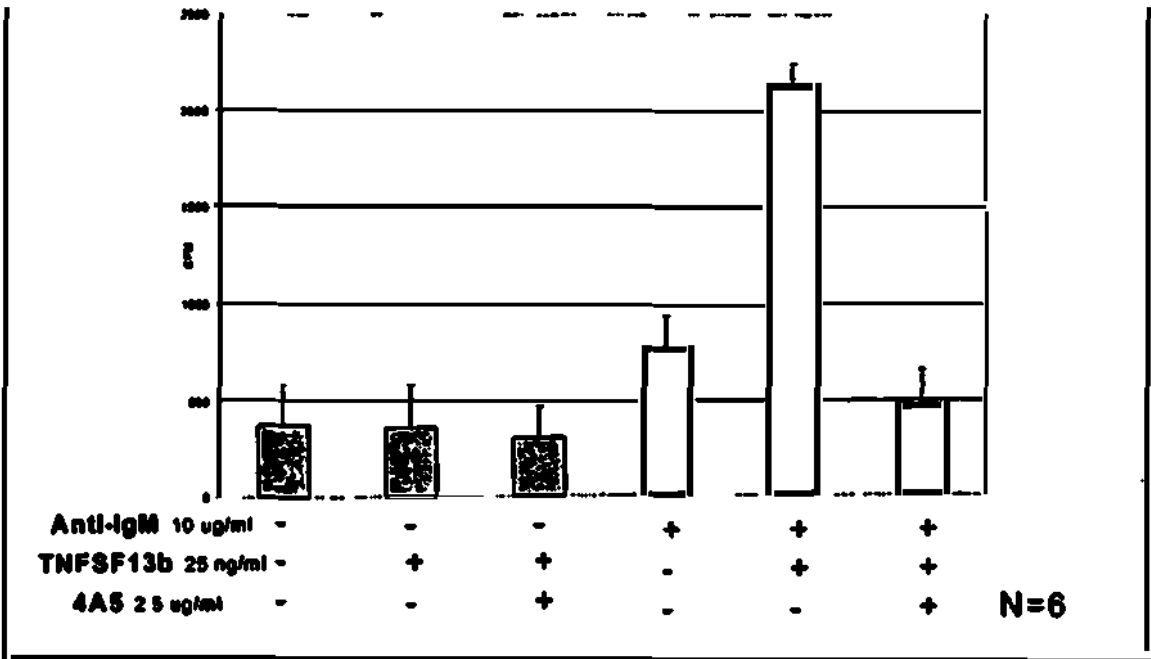
% Inhibition of huTNFSF13b and IL 1 Proliferation by 4A5-3.1 1-B4
 $IC_{50} = 76 \text{ ng/ml}$



135
136

Fig. 2/2

Neutralización de la proliferación inducida por huTNFSF13b con 4A5-3 1 1-B4 en linfocitos B primarios



136
137

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

5

<120> ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA hTNF α 13b ANTAGONISTAS

10 <130> X-15239 PCT

<160> 16

15

<170> PatentIn versión 3 1

20

<210> 1

<211> 327

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

137
1956

2/24

<400> 1

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

5 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgctacttag cctggtagca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
180

10

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac tccactctca ccatcagcag cctagagcct
240

15 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcttcggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaaatcaa acgaact
327

20

<210> 2

<211> 109

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

138
-1991

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 20 25 30

10

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

15

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 25 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

30

139
- 140

<210> 3

<211> 33

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

agggccagtc agagtgttag ccgctactta gcc

33

15

<210> 4

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala

30

1

5

10

140
H

<210> 5

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

gatgcatcca acagggccac t

15 21

<210> 6

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 6

30 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

141
-172

6/24

1 5

<210> 7

5

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 7

15 cagcagcgta gcaactggcc tggacg
27

<210> 8

20

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 8

30

142
-143

7/24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

5 <210> 9

<211> 426

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> péptido sig

<222> (1) (57)

20

<223>

25 <400> 9

atgaacacc tgtggttctt cctctctctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag
60

gtgcaactac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccttcacc

30 120

tgcgctgctt atggtgggtc cttcagtggg tactactgga gctggatccg ccagccccc
180

5 ggggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatagtg gaagcaccaa ctacaacccg
240

tccttcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtc ctccctgaaa
300

10

ctgagctctg tgaccgcgcg ggacacggct gtgtattact gtgcgagagg gtattacgat
360

atcttgactg gttattatta ctactttgac tactggggcc agggaaacct ggccaccgtc
15 420

tcctca
426

20

<210> 10

<211> 142

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

30

9/24

144
H.S.

<220>

<221> SEÑAL

5 <222> (1) (19)

<223>

10

<400> 10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20 25 30

20

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe

35 40 45

25 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

30 65 70 75 80

145
-1/16

10/24

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

5

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

10

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
115 120 125

15 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 11
20

<211> 15

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 11

30 ggtgggtect tcaagtggta ctactggagc

146
9/17/77

11/24

<210> 12

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 12

15 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 13

20

<211> 48

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 13

30 gaaatcaatc atagtggag caccaactac aacccgtccc tcaagagt

14.7
11/8

12/24

48

<210> 14

5

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 14

15

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20 <210> 15

<211> 45

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

30

148
A119

<400> 15

gggtattacg atattttgac tggttattat tactactttg actac

45

5

<210> 16

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 16

Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

20

<210> 17

<211> 450

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

30

149
149

14/24

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser

1 5 10 15

5

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser

20 25 30

10

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

15 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

50 55 60

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

20 65 70 75

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

80 85 90

25

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly

95 100 105

30

150
151

Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120

5 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 125 130 135

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 10 140 145 150

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 155 160 165
 15

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175 180

20 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 185 190 195

25 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 200 205 210

Lys Pro Ser Gln Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 30 215 220 225

151
152

16/24

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
230 235 240

5

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

10

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

15

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

20

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
290 295 300

25

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

30

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
320 325 330

152
157

17/24

	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
						335				340					345
5	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu
						350				355					360
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
10						365				370					375
	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
						380				385					390
15															
	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
						395				400					405
20															
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
						410				415					420
25	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
						425				430					435
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
30						440				445					450

18/24

153
194

<210> 18

5 <211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 18

15 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser

1

5

10

15

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser

20

20

25

30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

25

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

50

55

60

30

154
157

19/24

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
65 70 75

5 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly
10 95 100 105

Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120
15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
125 130 135

20 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
140 145 150

25 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
155 160 165

30 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

155
156

20/24

		170		175		180
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro					
5		185		190		195
	Ser Ser Ser Leu GLy Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His					
		200		205		210
10						
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser					
		215		220		225
15						
	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
		230		235		240
20	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp					
		245		250		255
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val					
25		260		265		270
	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val					
		275		280		285
30						

BB
757

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

5

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315

10 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
320 325 330

15 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
350 355 360

20

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
365 370 375

25

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
380 385 390

30 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

151
150

22/24

395

400

405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

5

410

415

420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

425

430

435

10

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

440

445

450

15 Pro Gly Lys

453

20

<210> 19

*

<211> 214

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

30

150
~~150~~
 150

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

5

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 20 25 30

10

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

15 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

25

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

30

159
160

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

5 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
10 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

15

Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

20

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

25 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 214

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

X15239

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X15239	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US02/21842	International filing date (day/month/year) 15 August 2002 (15.08.2002)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 16 August 2001 (16.08.2001)
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☒ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title.

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract.

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/21842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07K 16/00, A61K 39/395

US CL : 530/387.1, 388.1, 388.15, 388.24, 388.8, 388.85; 424/130.1, 133.1, 155.1, 156.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/387.1, 388.1, 388.15, 388.24, 388.8, 388.85; 424/130.1, 133.1, 155.1, 156.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
✓ A	WO 98/18921 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 07 May 1998 (07.05.98), see entire document, especially pages 10-11.	1-41

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents.

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 January 2003 (06.01.2003)

Date of mailing of the international search report

19 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized official

Larry K. Helms

Telephone No. (703) 308-0196

162
169

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/21842

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAPLUS, MEDLINE, WEST, BIOSIS, USPATFULL, PIR, SWISSPROT, GENESEQ, SPTREMBL

search terms: SEQ IS NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, hmfef13b, antibody, CDR, human, humanized, cancer, organ transplant

162
164
163

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 04012060 00000000 Folios: 163
Fecha (HNB): 2004-02-13 09:28:00
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE HNCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	(/)	(/)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(/)	(/)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(/)	(/)
- Descripción de la invención.	(/)	(/)
- Dibujos de ser estos pertinentes.	(/)	(/)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

Firma Responsable: *Clara M. RIVERA*

Fecha: *13-02-04*

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE.
Apoderado(a)

Oficio N°

04757

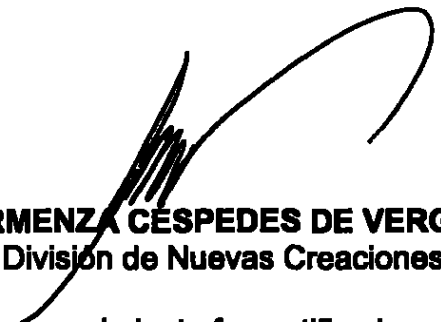
ASUNTO:	Radicación N°	04-12060
	Solicitud internacional	PCT/US02/21842
	Fecha inicio fase nacional	16/03/04
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- Los dibujos adjuntos no son legibles o copiables para trámites posteriores de publicación y título.
- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 07 MAYO 2004
202051