



Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

113

CSA295322
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Handwritten signature

OL
RGT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

RGT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-48120

EXAMEN NACIONAL

EXPEDIENTE No.

4. TITULO ANTICUERPOS PARA LINFOTOXINA-ALFA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 110.323


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638 ~FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,
California 94080, Estados Unidos de AméricaNacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: Camellia W. ADAMS, Jane L. GROGAN, Austin L. GURNEY, Krista
MCCUTCHEON.Dirección: 116C Flynn Avenue, Mountain View, CA 94043, US; 335 Hugo Street, San
Francisco, CA 94122, US; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114, US; 1512 Carol
Avenue, Burlingame, CA 94010, US (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/081154

Fecha 11-10-2007

Publicación Internacional No. WO 2008/063776 A2

Fecha 29-05-2008

6 Título (54): ANTICUERPOS PARA LINFOTOXINA-ALFA

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

12-10-2006

60/829,257

US

18-05-2007

60/938,999

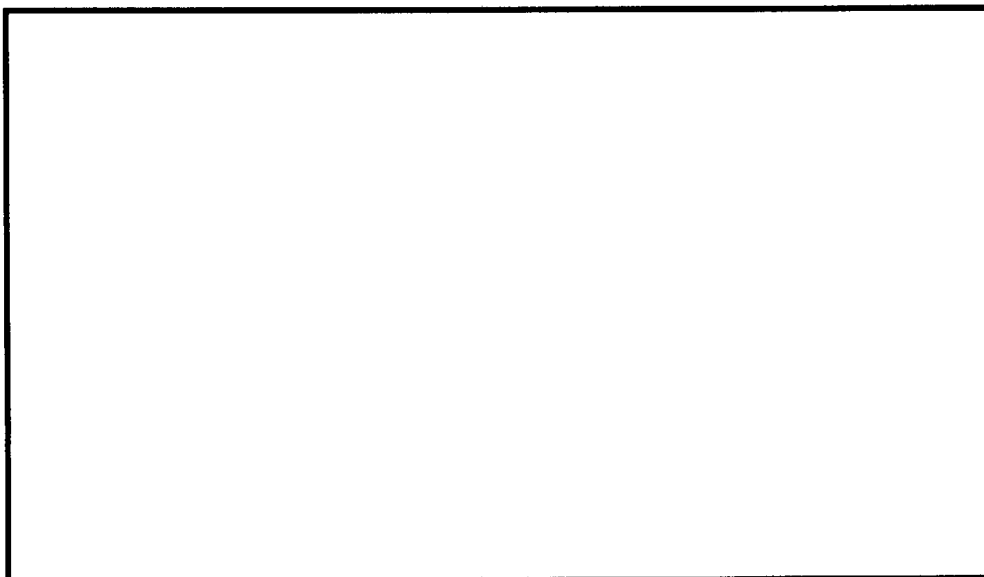
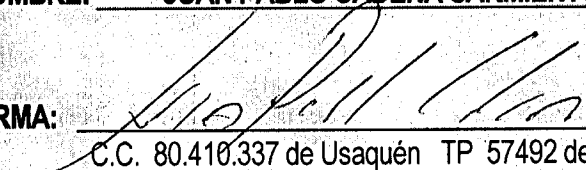
9 Comprobante de pago No. 09-11.386, 09-4.898, 09-4.899, 09-4.900, 09-4.901, 09-4.873, 09-4.851

Fecha 11-05-2009

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

PI02-F06 (2008-06-09)

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 540.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ 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 de 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 12x12.
- ☐ 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: Documentos PCT
Listado de Secuencias
Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$2'175.000
(87*\$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12** Solicito la concesión de la patente,**NOMBRE:** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**FIRMA:**
C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 11,386
FECHA : FEBRERO 11 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80854211	11/02/2009	35,342,120.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

110 323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,898
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-048130-00000-0000
Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
			TOTAL : \$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

110 323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,899
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

6
110 323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,900
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,901
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130-00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
			TOTAL : \$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

8

910 323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,873
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
		TOTAL :	\$ 125,000.00

SON: CIENTO VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,851
FECHA : ENERO 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 638

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
		TOTAL :	\$ 50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

BO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE NO. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 May 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/063776 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 16/24 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/525 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/081154

(22) International Filing Date: 11 October 2007 (11.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/829,257 12 October 2006 (12.10.2006) US
60/938,999 18 May 2007 (18.05.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ADAMS, Camella W. [US/US]; 116C Flynn Avenue, Mountain View, California 94043 (US). GROGAN, Jane L. [AU/US];

335 Hugo Street, San Francisco, , California 94122 (US). GURNEY, Austin L. [US/US]; 946 Diamond Street, San Francisco, California 94114 (US). MCCUTCHEON, Krista [CA/US]; 1512 Carol Avenue, Burlingame, California 94010 (US).

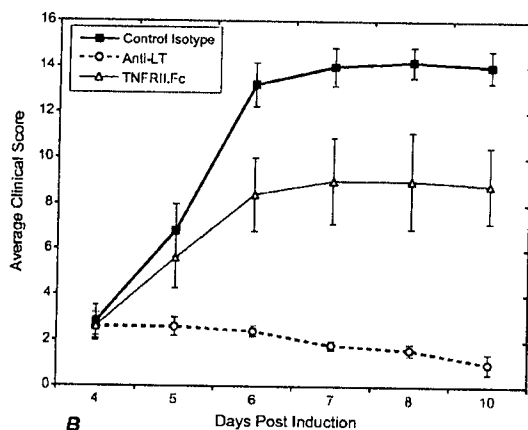
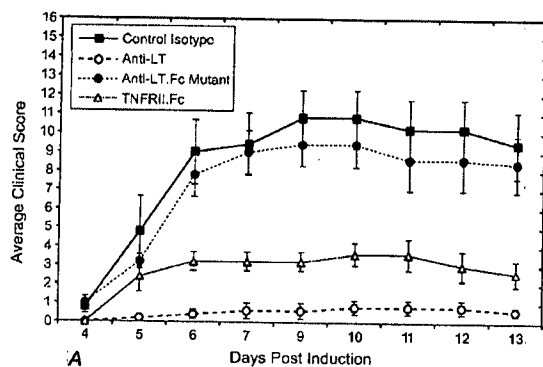
(74) Agent: HASAK, Janet E.; Genentech, Inc., MS 49, 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

(57) Abstract: The invention provides various antibodies that bind to lymphotoxin- α , methods for making such antibodies, compositions and articles incorporating such antibodies, and their uses in treating, for example, an autoimmune disorder. The antibodies include murine, chimeric, and humanized antibodies



GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
- *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

5

RELATED APPLICATIONS

This non-provisional application claims the benefit of priority of US Provisional Application Ser. No. 60/829,257 filed on 12 October 2006, and of US Provisional Application Ser. No. 60/938, 999 filed on 18 May 2007, which are incorporated by reference in their entirety.

10

FIELD OF THE INVENTION

The present invention concerns antibodies and their uses to treat autoimmune disorders. More particularly, the present invention concerns antibodies that bind to lymphotoxin- α and may also block binding of the lymphotoxin- α ligand to one or more receptors.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

TNF and LT

Autoimmune diseases remain clinically important diseases in humans. As the name implies, autoimmune diseases wreak their havoc through the body's own immune system. While the pathological mechanisms differ among individual types of autoimmune diseases, one general mechanism involves the binding of certain antibodies (referred to herein as self-reactive antibodies or autoantibodies) present. Physicians and scientists have identified more than 70 clinically distinct autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis (MS), vasculitis, immune-mediated diabetes, and lupus such as systemic lupus erythematosus (SLE). While many autoimmune diseases are rare – affecting fewer than 200,000 individuals – collectively, these diseases afflict millions of Americans, an estimated five percent of the population, with women disproportionately affected by most diseases. The chronic nature of these diseases leads to an immense social and financial burden.

20

25

Tumor Necrosis Factor (TNF)-related proteins are recognized in the art as a large family of proteins having a variety of activities ranging from host defense to immune regulation to apoptosis. TNF was first identified as a serum-derived factor that was cytotoxic for several transformed cell lines *in vitro* and caused necrosis of certain tumors *in vivo*. A similar factor in the superfamily was identified and referred to as lymphotoxin ("LT"). Due to observed similarities between TNF and LT in the early 1980's, it was proposed that TNF and LT be referred to as TNF- α and TNF- β , respectively. Scientific literature thus makes

30

35

reference to both nomenclatures. As used in the present application, the term "TNF" refers to TNF- α . Later research revealed two forms of lymphotoxin, referred to as LT α and LT β . US 2005-0129614 describes another polypeptide member of the TNF ligand super-family based on structural and biological similarities, designated TL-5.

5 Members of the TNF family of proteins exist in membrane-bound forms that act locally through cell-cell contact, or as secreted proteins. A family of TNF-related receptors react with these proteins and trigger a variety of signalling pathways including cell death or apoptosis, cell proliferation, tissue differentiation, and proinflammatory responses. TNF- α by itself has been implicated in inflammatory diseases, autoimmune diseases, viral, bacterial,
10 and parasitic infections, malignancies, and/or neurodegenerative diseases and is a useful target for specific biological therapy in diseases such as RA and Crohn's disease.

Cloning of the TNF and LT α proteins and further characterization of their respective biological activities reveal that the proteins differ in many aspects. Aggarwal *et al.*, *Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation*, Wiley-Liss, Inc. 1990, pp.
15 375-384. For instance, LT α is a secreted, soluble protein of approximately 20 kDa (25 kDa if N- and O-glycosylated). TNF, in contrast, has no site for glycosylation and is synthesized with an apparent transmembrane domain that results in the original protein transcript being cell associated. Proteolysis of the cell-associated TNF protein results in the release of the soluble form of the protein having a molecular weight of approximately 19 kDa. TNF is
20 produced primarily by activated macrophages, whereas LT is produced by activated lymphocytes. Wong *et al.*, *Tumor Necrosis Factors: The Molecules and their Emerging Role in Medicine*, Beutler, B., ed., Raven Press (1991), pp. 473-484. The sequences encoding TNF and LT α also differ. TNF and LT α share only approximately 32% amino acid sequence identity. Regarding the different biological activities of TNF and LT α , TNF increases
25 production of endothelial-cell interleukin-1 ("IL-1"), whereas LT α has little effect thereon. Further, TNF induces production of macrophage-colony-stimulating factor from macrophages, whereas LT α has no effect thereon. These and other biological activities are discussed in Aggarwal, *Tumor Necrosis Factors: Structure, Function and Mechanism of Action*, Aggarwal and Viecek, eds. (1992), pp. 61-78.

30 TNF and LT α are described further in the review articles by Spriggs, "Tumor Necrosis Factor: Basic Principles and Preclinical Studies," *Biologic Therapy of Cancer*, DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company (1991) Ch. 16, pp. 354-377; Ruddle, *Current Opinion in Immunology*, 4:327-332 (1992); Wong *et al.*, "Tumor Necrosis Factor," *Human*

Monocytes, Academic Press (1989), pp. 195-215; and Paul *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 6:407-438 (1988).

In non-tumor cells, TNF and TNF-related cytokines are active in a variety of immune responses. Both TNF and LT α ligands bind to and activate TNF receptors (p55 or p60 and p75 or p80; herein called "TNF-R").

Cell-surface LT complexes have been characterized in CD4+ T cell hybridoma cells (II-23.D7), which express high levels of LT (Browning *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 1230-1237 (1991); Androlewicz *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 2542-2547 (1992)). The expression and biological roles of LT β -R, LT subunits, and surface LT complexes are reviewed in Ware *et al.*, "The ligands and receptors of the lymphotoxin system", in *Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol.*, Springer-Verlag, pp. 175-218 (1995).

LT α expression is induced and LT α secreted primarily by activated T and B lymphocytes and natural killer (NK) cells. Among the T helper cell subclasses, LT α appears to be produced by Th1 but not Th2 cells. LT α has also been detected in melanocytes. LT β (also called p33) has been identified on the surface of T lymphocytes, T cell lines, B cell lines and lymphokine-activated killer (LAK) cells. Studies have shown that LT β is not functional in the absence of LT α .

LT α exists either as a homotrimer (LT α 3) or a heterotrimer with LT β . These heterotrimers contain either two subunits of LT α and one subunit of LT β (LT α 2 β 1), or one subunit of LT α and two of LT β (LT α 1 β 2).

The only known cell-surface receptors for the LT α homotrimer are the two TNF receptors, p55 and p75. However, the LT α β heterotrimer, LT α 1 β 2, does not bind to the TNF receptors and instead binds to a member of the TNF receptor superfamily, lymphotoxin β receptor (referred to herein as LT β -R). The heterotrimeric form LT α 2 β 1 likely binds TNF receptors.

LT β -R has a well-described role both in the development of the immune system and in the functional maintenance of a number of cells in the immune system, including follicular dendritic cells and a number of stromal cell types (Matsumoto *et al.*, *Immunol. Rev.* 156:137 (1997)). Known ligands to the LT β -R include not only LT α 1 β 2, but also a second ligand called LIGHT (Mauri *et al.*, *Immunity* 8:21 (1998)). Activation of LT β -R has been shown to induce the apoptotic death of certain cancer cell lines *in vivo* (US 6,312,691). Humanized antibodies to LT β -R and methods of use thereof are provided in US 2004-0058394 and stated as being useful for treating or reducing the advancement, severity, or effects of neoplasia in

humans. Further, EP 1585547 (WO 2004/058183) (LePage and Gill) discloses combination therapies that include a composition that activates LT β -R signaling in combination with one or more other chemotherapeutic agents, as well as therapeutic methods and screening methods for identifying agents that in combination with a LT β -R agonist agent have an additive effect on tumor inhibition.

LT is important for lymphoneogenesis, as evident from knockout mice. See Futterer *et al. Immunity*, 9 (1): 59-70 (1998), showing that mice deficient in LT β -R lacked lymph nodes and Peyer's patches and also showing impaired antibody affinity maturation. Rennert *et al. Immunity*, 9 (1): 71-9 (1998) reported that an agonist monoclonal antibody against LT β -R restored the ability to make lymph nodes in LT α knockout mice. See also Wu *et al. J. Immunology*, 166 (3): 1684-9 (2001) and Endres *et al. J. Exp. Med.*, 189 (1): 159-68 (1999); Dohi *et al. J. Immunology*, 167 (5): 2781-90 (2001); and Matsumoto *et al. J. Immunology*, 163 (3): 1584-91 (1999). Korner *et al. Eur. J. Immun.*, 27 (10): 2600-9 (1997) reported that mice lacking both TNF and LT showed retarded B-cell maturation and serum immunoglobulin deficiencies, whereas mice lacking only TNF showed no such deficiencies.

In addition, LT is important for inflammation. LT α is overexpressed in the pancreas of RIP.LT α transgenic mice, which have shown inflammation, increased chemokine expression, and a lymphoid-like structure, and in which overexpression of LT β alone has demonstrated no additional inflammation. Further, LT α -deficient mice exhibit impaired TNF- α production, and defective splenic architecture and function are restored when such mice are crossed to TNF-transgene (Kollias, *J. Exp. Med.*, 188:745 (1998); Chaplin, *Ann Rev Imm* 17:399 (1999)), and decreased TNF levels are restored after pathogenic challenge (Eugster, *Eur. J. Immun.* 31:1935 (2001)).

When TNF- α or LT α_3 interacts with the TNF receptors TNFRI and/or TNFRII, the result is proinflammatory responses and/or apoptosis. When LT $\alpha_1\beta_2$ interacts with the receptor LT β -R, the result is lymphoneogenesis and induction of chemokines and adhesion molecules. Autoimmune diseases are associated with lymphoneogenesis and inflammatory responses, and there is increased LT expression in patients with autoimmune disease, including MS, inflammatory bowel disease (IBD), and RA (Weyand *et al. Curr. Opin. Rheumatol.*, 15: 259-266 (2003); Selmaj *et al. J. Clin. Invest.*, 87: 949-954 (1991); Matusevicius *et al. J. Neuroimm.*, 66: 115-123 (1996); Powell *et al. International Immunology*, 2 (6): 539-44 (1990); Zipp *et al. Annals of Neurology*, 38/5: 723-730 (1995); Voskuhl *et al. Autoimmunity* 15 (2): 137-43 (1993); Selmaj *et al. J. Immunology*, 147: 1522-

29 (1991); Agyekum *et al.*, *Journal Pathology*, 199 (1): 115-21 (2003); and Takemura *et al.*, *J. Immunol.*, 167: 1072 (2001)).

As to MS specifically, serum LT α correlates with lesions/disease burden in MS (Kraus *et al.*, *Acta Neurologica Scandinavica*, 105 (4): 300-8 (2002)). LT α is involved in demyelination but not remyelination in an *in vivo* cuprizone model, whereas TNF- α is required for both (Plant *et al.*, *Glia* 49:1-14 (2005)).

As to RA specifically, levels of human LT α 3 and TNF- α in RA patients are elevated over those of normal donors (Stepien, *Eur Cytokine Net* 9: 145 (1998)). The roles of LT α in RA include: serum LT α is present in some RA patients, increased LT α protein is present in synovium, the LT pathway is associated with ectopic lymphoneogenesis in synovium, and there is increased LT β -R expression on fibroblast-like synoviocytes in RA patients. In addition, a case report discloses that neutralizing LT α 3 is beneficial for an infliximab-resistant RA patient (Buch *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 63: 1344-46 (2004)). Also, Han *et al.*, *Arthrit. Rheumat.*, 52: 3202-3209 (2005) describes that blockading the LT pathway exacerbates autoimmune arthritis by enhancing the Th1 response.

Preclinical efficacy for prevention and treatment with LT β R-Ig in collagen-induced arthritis (CIA) is shown in Fava *et al.*, *J. Immunology*, 171 (1): 115-26 (2003). Further, LT α -deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Suen *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186: 1233-40 (1997); Sean Riminton *et al.*, *J. Exp. Med.*, 187 (9): 1517-28 (1998)). There is also published efficacy of LT β R-Ig in EAE (Gommerman *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 112 (5): 755-67 (2003)). Also, LT β R-Ig disrupts lymphogenesis in mice. Mackay *et al.*, *Europ. J. Immunol.* 27 (8): 2033-42 (1997)). Further, administration of LT β R-Ig decreases insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic mice (Wu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 193 (11): 1327-32 (2001)). The role of LT in lymphogenesis in non-human primates was investigated by Gommerman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 110 (9): 1359-69 (2002) using LT β R-Ig. Further, LT α -deficient mice are less susceptible to *M. bovis* BCG than TNF- α -deficient mice. Eugster *et al.*, *Europ. J. Immunol.*, 31: 1935 (2001).

LT has also been used to treat cancer. See US 5,747,023.

Antibodies

Antibodies are proteins that exhibit binding specificity to a specific antigen. Native antibodies are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages

varies between the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain
5 of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light- and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains
10 differ extensively in sequence among antibodies and are responsible for the binding specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity determining regions (CDRs) both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of the variable
15 domains are called the framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of
20 antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions. Depending on the amino acid sequence of the constant region of their heavy chains, antibodies or immunoglobulins can be assigned to different
25 classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.* IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4; IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant regions that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. Of the human immunoglobulin classes, only human IgG1, IgG2, IgG3, and IgM are known to activate
30 complement, and human IgG1 and IgG3 mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) more effectively than IgG2 and IgG4.

Two main approaches have been used to develop therapeutic compounds that inhibit TNF- α . The first, exemplified by infliximab, a chimeric monoclonal antibody to TNF- α also

known as REMICADE[®], is to neutralize TNF- α action by using a specific monoclonal antibody of high affinity and potency to prevent binding of TNF- α to its receptors. The second, exemplified by etanercept, also known as ENBREL[®], is to inhibit TNF- α by using a TNF receptor-based molecule that functions as a "decoy" to reduce the binding of TNF- α to its natural receptors. Although both types of molecules can prevent the binding of TNF α to its receptors, receptor-based inhibitors such as etanercept will also prevent receptor binding of LT α .

In the patent literature, antibodies to cachectin (TNF), disclosed by EP 212489, are reported as useful in diagnostic immunoassays and in therapy of shock in bacterial infections. EP 218868 discloses monoclonal antibodies to human TNF and their uses. EP 288,088 discloses anti-TNF antibodies, and their utility in immunoassay diagnosis of pathologies, in particular Kawasaki's pathology and bacterial infection. Anti-TNF antibodies are also described, for example, in EP 1585477 (Giles-Komar *et al.*); US 2006-0147452; US 2006-0222646; and US 2006-0121037. A method of treating RA by using a single-domain antibody polypeptide construct that antagonizes human TNF α 's binding to a receptor is described in US 2005-0271663. Methods of treating RA using anti-TNF receptor fusion proteins are described in US 2005-0260201. Methods for treating a TNF-mediated disease using a composition comprising methotrexate and an anti-TNF antibody, including RA, Crohn's disease, and acute and chronic immune diseases associated with transplantation, are described in EP 1593393. Antibodies that bind to TNF-R include those described in US 7,057,022. Novel proteins with TNF-alpha antagonist activity are described in US 7,056,695. US 2006-0147448 discloses treatment of immunological renal disorders by LT pathway inhibitors.

LT β and LT β /LT α complexes and LT β -R and antibodies thereto as well as LT β blocking agents are described, for example, in WO 1992/00329; WO 1994/13808; US 5,661,004; US 5,795,964; EP 0954333; US 5,670,149; US 5,925,351; US 2005-0037003; US 6,403,087; US 6,669,941; US 6,312,691; US 7,001,598; US 7,030,080; US 2006-0222644; and US 2005-0163747. The application US 2006-0134102 discloses LT β -R agents in combination with chemotherapeutic agents. Antibodies to the LT β -R are described in US 2005-0281811. See also WO 2006/114284 regarding use of LT β -R antibodies to prevent and/or treat obesity and obesity-related disorders. Humanized antibodies specific for the LT β -R alone or in combination with chemotherapeutic agent(s) in therapeutic methods are disclosed in EP 1539793. LT α and antibodies thereto are described, for example, in US

4,959,457; 5,824,509; 4,920,196; and 5,683,688; US 2005-0266004 (WO 2005/067477) and US 5,188,969 (EP 347728B1). See also US 2002-0039580; WO 2004/039329; and US 2002-0197254 regarding LT β or LT β -R technology. Multivalent antibodies (that bind the TNF receptor superfamily) are described, for example, in US 2002-0004587 and US 2006-0025576.

There is a continuing need in the art to produce antibodies, in particular, therapeutic antibodies having improved function, such as anti-LT α antibodies or fragments thereof that block LT α , since LT α has more interactions with the various receptors than TNF- α or LT β alone.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is in part based on the identification of a variety of antagonists of the LT biological pathway, which is a biological/cellular process presenting as an important therapeutic target. The invention provides compositions and methods based on interfering with LT α activation, including but not limited to interfering with LT α binding to various receptors.

Accordingly, the invention is as claimed. In one aspect, the invention provides an isolated anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody comprising at least one complementarity-determining region (CDR) sequence selected from the group consisting of:

(a) a CDR-L1 sequence comprising amino acids A1-A11, wherein A1-A11 is KASQAVSSAVA (SEQ ID NO:1) or RASQAVSSAVA (SEQ ID NO:2), or comprising amino acids A1-A17, wherein A1-A17 is KSSQSLLYSTNQKNFLA (SEQ ID NO:3) or KSSQSLLYSANQKNFLA (SEQ ID NO:4) or KSSQSLLYSTNQKNALA (SEQ ID NO:6), where N is any amino acid (chimeric 2C8 or humanized 2C8.v2/2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/humanized 3F12.v14, or 3F12 clone 14 or 17, respectively);

(b) a CDR-L2 sequence comprising amino acids B1-B7, wherein B1-B7 is SASHRYT (SEQ ID NO:7) or WASTRDS (SEQ ID NO:8) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14, respectively);

(c) a CDR-L3 sequence comprising amino acids C1-C9, wherein C1-C9 is QQHYSTPWT (SEQ ID NO:9) or QENYSTPWT (SEQ ID NO:11) or QQYYSYPRT (SEQ ID NO:13) or QQYASYPRT (SEQ ID NO:14) or QQYYAYPRT (SEQ ID NO:15), where N is any amino acid (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2 or 2C8 clone G7 or chimeric

3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14 or 3F12 clone 20 or 3F12 clone 21, respectively);

(d) a CDR-H1 sequence comprising amino acids D1-D10, wherein D1-D10 is GYTFTSYVIH (SEQ ID NO:16) or GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:17) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14, respectively);

(e) a CDR-H2 sequence comprising amino acids E1-E17, wherein E1-E17 is YNNPYNDGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18) or EISPGSGSTNYNEEFKG (SEQ ID NO:19) or YNNPYNAGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:101) or EINPGSGSTIYNEKFKG (SEQ ID NO:110), wherein N is any amino acid (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2 or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5, or humanized 2C8.vX, or humanized 3F12.v14, respectively); and

(f) a CDR-H3 sequence comprising amino acids F1-F9, wherein F1-F9 is PTMLPWFAY (SEQ ID NO:20), or comprising amino acids F1-F5, wherein F1-F5 is GYHGY (SEQ ID NO:21) or GYHGA (SEQ ID NO:22) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14 or 3F12 clone 12, respectively).

Preferably, SEQ ID NO:3 is KSSQSLLYSTAQKNFLA (SEQ ID NO:5) (3F12 clone 15). In another preferred aspect, SEQ ID NO:11 is QESYSTPWT (SEQ ID NO:10) (2C8 clone A8/humanized 2C8.vX) or QEVYSTPWT (SEQ ID NO:12) (2C8 clone H6).

In a further preferred embodiment, the CDR-L1 sequence is SEQ ID NO:2 or 3 or 4 or 6.

In another preferred aspect, the antibody comprises either (i) all of the CDR-L1 to CDR-L3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15; or (ii) all of the CDR-H1 to CDR-H3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or all of SEQ ID NOS:16, 101, and 20, or all of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or all of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.

In a still further preferred aspect, the antibody comprises either all of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or all of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or all of SEQ ID NOS:16, 101, and 20. In an alternative embodiment, the antibody comprises either all of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or all of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22. In an alternative embodiment, the antibody

comprises either all of SEQ ID NOS:4, 8, and 14, or all of SEQ ID NOS:17, 110, and 21. In other embodiments, the antibody comprises (i) all of the CDR-L1 to CDR-L3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 or 2, 7 and 9, or of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15; and (ii) all of the CDR-H1 to CDR-H3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or of SEQ ID NOS:16, 101, and 20, or of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.

In addition, the antibodies herein are preferably chimeric or humanized, most preferably humanized. A humanized antibody of the invention may comprise one or more suitable human and/or human consensus non-CDR (e.g., framework) sequences in its heavy- and/or light-chain variable domains, provided the antibody exhibits the desired biological characteristics (e.g., a desired binding affinity).. Preferably, at least a portion of such humanized antibody framework sequence is a human consensus framework sequence.

In some embodiments, one or more additional modifications are present within the human and/or human consensus non-CDR sequences. In one embodiment, the heavy-chain variable domain of an antibody of the invention comprises at least a portion of (preferably all of) a human consensus framework sequence, which in one embodiment is the subgroup III consensus framework sequence. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant subgroup III consensus framework sequence modified at at least one amino acid position. For example, in one embodiment, a variant subgroup III consensus framework sequence may comprise a substitution at one or more of positions 71, 73, and/or 78. In one embodiment, said substitution is R71A, N73T, and/or N78A, in any combination thereof, preferably all three. In another embodiment, these antibodies comprise or further comprise at least a portion of (preferably all of) a human κ light-chain consensus framework sequence. In a preferred embodiment, an antibody of the invention comprises at least a portion of (preferably all of) a human κ subgroup I framework consensus sequence.

The amino acid position/boundary delineating a CDR of an antibody can vary, depending on the context and the various definitions known in the art (as described below). Some positions within a variable domain may be viewed as hybrid hypervariable positions in that these positions can be deemed to be within a CDR under one set of criteria while being deemed to be outside a CDR under a different set of criteria. One or more of these positions can also be found in extended CDRs (as further defined below). The invention provides antibodies comprising modifications in these hybrid hypervariable positions. In one

embodiment, these hybrid hypervariable positions include one or more of positions 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94, and 102 in a heavy-chain variable domain. In one embodiment, these hybrid hypervariable positions include one or more of positions 24-29, 35-36, 46-49, 56, and 97 in a light-chain variable domain. In one embodiment, an antibody
 5 of the invention comprises a variant human subgroup consensus framework sequence modified at one or more hybrid hypervariable positions.

In another preferred aspect, the antibody binds to LT α 3 and blocks the interaction of LT α 3 with tumor necrosis factor receptor-1 (TNFRI) and tumor necrosis factor receptor-2 (TNFRII). Preferably, it binds also to one or more LT $\alpha\beta$ complexes and especially on the
 10 cell surface. Preferably, it also blocks the function of one or more LT $\alpha\beta$ complexes. Also, it preferably decreases levels of inflammatory cytokines associated with rheumatoid arthritis in an *in vitro* arthritis assay such as an *in vitro* collagen-induced arthritis assay or an *in vitro* antibody-induced arthritis assay.

In some aspects, such as the murine S5H3 antibody, the antibody does not block the interaction of LT $\alpha\beta$ with LT β -R. In other aspects, the antibody does block the interaction of
 15 LT $\alpha\beta$ with LT β -R. Preferably, the antibody modulates LT $\alpha\beta$ -expressing cells. In other embodiments, the anti-LT α antibody substantially neutralizes at least one activity of at least one LT α protein. Preferably, the antibody herein targets any cell expressing LT α , and more preferably depletes LT α -positive or -secreting cells.

The preferred antibody binds LT α with an affinity of at least about 10^{-12} M (picomolar levels), and more preferably at least about 10^{-13} M. Also preferred is an IgG antibody, more preferably human IgG. Human IgG encompasses any of the human IgG
 20 isotypes of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4. Murine IgG encompasses the isotypes of IgG1, 2a, 2b, and 3. More preferably, the murine IgG is IgG2a and the human IgG is IgG1. In other preferred embodiments of the human IgG, the VH and VL sequences provided are joined to
 25 human IgG1 constant region.

In another embodiment, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:23 or 24, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:25 or 26, or having light-chain and heavy-chain variable domains
 30 comprising both SEQ ID NOS:23 and 25, or comprising both SEQ ID NOS:24 and 26.

In a still further embodiment, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:27 or 28, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:29 or 30 or 31, or having light-chain and heavy-chain

variable domains comprising both SEQ ID NOS:27 and 29, or comprising both SEQ ID NOS:27 and 30, or comprising both SEQ ID NOS:27 and 31, or comprising both SEQ ID NOS:28 and 30, or comprising both SEQ ID NOS:28 and 31.

In a still further aspect, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:102, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:103, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:102 and 103.

In a still further aspect, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:108, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:109, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:108 and 109.

In other preferred embodiments, the antibody has an Fc region. In one aspect, such Fc region is a wild-type (or native-sequence) Fc region. In another embodiment, the antibody further comprises one or more amino acid substitutions in its Fc region that result in the polypeptide exhibiting at least one of the following properties: increased Fc γ R binding, increased antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), increased complement-dependent cytotoxicity (CDC), decreased CDC, increased ADCC and CDC function, increased ADCC but decreased CDC function, increased FcRn binding, and increased serum half life, as compared to an antibody having a native-sequence Fc region. More preferably, the antibody further comprises one or more amino acid substitutions in its Fc region that result in it having increased ADCC function as compared to the same antibody having a native-sequence Fc region.

In a particularly preferred embodiment, the antibody has amino acid substitutions in its Fc region at any one or any combination of positions that are 268D, or 298A, or 326D, or 333A, or 334A, or 298A together with 333A, or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E and 272Y and 254T and 256E, or 250Q together with 428L, or 265A, or 297A, wherein the 265A substitution is in the absence of 297A and the 297A substitution is in the absence of 265A. In one particular embodiment, the Fc region has from one to three such amino acid substitutions, for example, substitutions at positions 298, 333,

and 334, and more preferably the combination of 298A, 333A, and 334A. The letter after the number in each of these designations represents the changed amino acid at that position.

Such anti-LT α antibodies effect varying degrees of disruption of the LT α /LT β signaling pathway. For example, in one embodiment, the invention provides an anti-LT α antibody (preferably humanized) wherein the monovalent affinity of the antibody to human LT α (e.g., affinity of the antibody as a Fab fragment to human LT α) is about the same as or greater than that of a murine antibody (e.g., affinity of the murine antibody as a Fab fragment to human LT α) produced by a hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number (ATCC) PTA-7538 (hybridoma murine Lymphotoxin alpha2 beta1 s5H3.2.2). The monovalent affinity is preferably expressed as a Kd value and/or is measured by optical biosensor that uses surface plasmon resonance (SPR) (BIAcore® technology) or radioimmunoassay.

Further antibodies herein include those with any of the properties above having reduced fucose relative to the amount of fucose on the same antibody produced in a wild-type Chinese hamster ovary cell. More preferred are those antibodies having no fucose.

In another embodiment, the invention provides an antibody composition comprising the antibodies described herein having an Fc region, wherein about 20-100% of the antibodies in the composition comprise a mature core carbohydrate structure in the Fc region that lacks a fucose. Preferably, such composition comprises antibodies having an Fc region that has been altered to change one or more of the ADCC, CDC, or pharmacokinetic properties of the antibody compared to a wild-type IgG Fc sequence by substituting an amino acid selected from the group consisting of A, D, E, L, Q, T, and Y at any one or any combination of positions of the Fc region selected from the group consisting of: 238, 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438 and 439.

The above-described antibody composition is more preferably one wherein the antibody further comprises an Fc substitution that is 268D or 326D or 333A together with 334A, or 298A together with 333A, or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and

332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E, wherein the letter after the number in each of these designations represents the changed amino acid at that position.

The above-described antibody composition is additionally preferably one wherein the antibody binds an Fc γ RIII. The composition is preferably one wherein the antibody has ADCC activity in the presence of human effector cells or has increased ADCC activity in the presence of human effector cells compared to the otherwise same antibody comprising a human wild-type IgG1Fc. The composition is also preferably one wherein the antibody binds the Fc γ RIII with better affinity, or mediates ADCC more effectively, than a glycoprotein with a mature core carbohydrate structure including fucose attached to the Fc region of the glycoprotein. In addition, the composition is preferably one wherein the antibody has been produced by a Chinese hamster ovary (CHO) cell, preferably a Lec13 cell. The composition is also preferably one wherein the antibody has been produced by a mammalian cell lacking a fucosyltransferase gene, more preferably the *FUT8* gene.

In one embodiment, the above-described composition is one wherein the antibody is free of bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) attached to the mature core carbohydrate structure. In an alternative embodiment, the composition is one wherein the antibody has bisecting GlcNAc attached to the mature core carbohydrate structure.

In another aspect, the above-described composition is one wherein the antibody has one or more galactose residues attached to the mature core carbohydrate structure. In an alternative embodiment, the composition is one wherein the antibody is free of one or more galactose residues attached to the mature core carbohydrate structure.

In a further aspect, the above-described composition is one wherein the antibody has one or more sialic acid residues attached to the mature core carbohydrate structure. In an alternative aspect, the composition is one wherein the antibody is free of one or more sialic acid residues attached to the mature core carbohydrate structure.

The above-described composition preferably comprises at least about 2% afucosylated antibodies, more preferably at least about 4% afucosylated antibodies, still more preferably at least about 10% afucosylated antibodies, even more preferably at least about 19% afucosylated antibodies, and most preferably about 100% afucosylated antibodies.

Also included herein is an anti-idiotypic antibody that specifically binds any of the antibodies herein.

A therapeutic agent for use in a host subject preferably elicits little to no immunogenic response against the agent in said subject. In one embodiment, the invention provides a chimeric or humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit a human anti-mouse antibody response (HAMA) at a substantially reduced level compared to a murine antibody in a host subject. In another example, the invention provides a chimeric or humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit minimal or no human anti-mouse antibody response (HAMA). In one example, an antibody of the invention elicits an anti-mouse antibody response that is at or below a clinically acceptable maximum level.

Antibodies of the invention can be used to modulate one or more aspects of LT α -associated effects, including but not limited to LT α receptor activation, downstream molecular signaling, cell proliferation, cell migration, cell survival, cell morphogenesis, and angiogenesis. These effects can be modulated by any biologically relevant mechanism, including disruption of ligand (e.g., LT α), binding to and blocking the LT α 3 receptor or one or both of the heterodimeric receptors, as well as receptor phosphorylation, and/or receptor multimerization.

In another aspect, the invention provides a method of inhibiting LT α -activated cell proliferation, said method comprising contacting a cell or tissue with an effective amount of one or more of the antibodies of the invention.

In a preferred embodiment, such LT α -activated cell proliferation is due to an autoimmune disorder, more preferably RA, MS, Sjogren's syndrome, lupus, myasthenia gravis, or IBD, or cancer, especially breast cancer, lung cancer, prostate cancer, a lymphoma, or leukemia. In another preferred embodiment, the method further comprises contacting the cell or tissue with a second medicament, wherein the first medicament is one or more of the antibodies herein. In a still further preferred embodiment, the cell or tissue is a mammalian cell or tissue, more preferably human, and still more preferably the method is an *in vivo* method. In such preferred *in vivo* method, preferably, the subject having the cell or tissue, most preferably a human subject, is administered the effective amount of the antibodies herein, such as by intravenous or subcutaneous administration.

In another embodiment, the invention provides a method of treating an autoimmune disorder in a subject comprising administering to the subject an effective amount of the antibody of the invention. Preferably, the autoimmune disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis (RA), lupus, Wegener's disease, inflammatory bowel disease (IBD), idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), thrombotic thrombocytopenic

purpura (TTP), autoimmune thrombocytopenia, multiple sclerosis (MS), psoriasis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies, myasthenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, Reynaud's syndrome, Sjögren's syndrome, glomerulonephritis, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, helicobacter-pylori gastritis, and chronic hepatitis C.

5 Preferably, the autoimmune disorder is RA, MS, Sjögren's syndrome, lupus, myasthenia gravis, or IBD, more preferably the autoimmune disorder is RA, IBD, lupus, or MS. More preferably, the lupus is systemic lupus erythematosus or lupus nephritis, and the IBD is Crohn's disease or ulcerative colitis.

10 In other aspects, the antibody is a naked antibody. In a further aspect, the antibody is conjugated with another molecule, such as a cytotoxic agent.

 In another aspect, the method is such that the antibody is administered intravenously. In an alternative aspect, the antibody is administered subcutaneously.

 In another embodiment, the subject has RA and the antibody induces a major clinical response in the subject.

15 In a further aspect, the subject has an abnormal level of one or more regulatory cytokines, anti-nuclear antibodies (ANA), anti-rheumatoid factor (RF) antibodies, creatinine, blood urea nitrogen, anti-endothelial antibodies, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), infiltrating CD20 cells, anti-double stranded DNA (dsDNA) antibodies, anti-Sm antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-phospholipid antibodies, anti-
20 ribosomal P antibodies, anti-Ro/SS-A antibodies, anti-Ro antibodies, anti-La antibodies, antibodies directed against Sjögren's-associated antigen A or B (SS-A or SS-B), antibodies directed against centromere protein B (CENP B) or centromere protein C (CENP C), autoantibodies to ICA69, anti-Smith antigen (Sm) antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-ribosomal P antibodies, autoantibodies staining the nuclear or perinuclear
25 zone of neutrophils (pANCA), anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, cross-reactive antibodies to GM1 ganglioside or GQ1b ganglioside, anti-acetylcholine receptor (AChR), anti-AChR subtype, or anti-muscle specific tyrosine kinase (MuSK) antibodies, serum anti-endothelial cell antibodies, IgG or anti-desmoglein (Dsg) antibodies, anti-centromere, anti-topoisomerase-1 (Scl-70), anti-RNA polymerase or anti-U3-ribonucleoprotein (U3-RNP)
30 antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-mitochondrial (AMA) or anti-mitochondrial M2 antibodies, anti-thyroid peroxidase (TPO), anti-thyroglobulin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-nucleic (AN), anti-actin (AA) or anti-smooth

muscle antigen (ASM) antibodies, IgA anti-endomysial, IgA anti-tissue transglutaminase, IgA anti-gliadin or IgG anti-gliadin antibodies, anti-CYP21A2, anti-CYP11A1 or anti-CYP17 antibodies, anti-ribonucleoprotein (RNP), or myositis-specific antibodies, anti-myelin associated glycoprotein (MAG) antibodies, anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies, anti-GM1 ganglioside, anti-sulfate-3-glycuronyl paragloboside (SGPG), or IgM anti-glycoconjugate antibodies, IgM anti-ganglioside antibody, anti-thyroid peroxidase (TPO), anti-thyroglobin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-myelin basic protein or anti-myelin oligodendrocytic glycoprotein antibodies, IgM rheumatoid factor antibodies directed against the Fc portion of IgG, anti-Factor VIII antibodies, or a combination thereof.

In another preferred aspect of this method, the antibody is administered no more than about once every other week, more preferably about once a month, to the subject.

In another embodiment, a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, is administered to the subject in an effective amount to treat the subject in the methods above. Such second medicament is preferably an immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker, a BAFF antagonist, a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), an integrin antagonist, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), a cytokine antagonist, or a combination thereof. Additionally, it may be a hyaluronidase glycoprotein as an active delivery vehicle. Most preferably it is a DMARD or methotrexate.

In another embodiment, the subject has never been previously treated with a medicament for the disorder. In a further aspect, the subject has never been previously treated with a TNF antagonist.

In an alternative embodiment, the subject has been previously treated with a medicament for the disorder, preferably with a TNF antagonist (such as an anti-TNF antibody or a TNF receptor-Ig such as etanercept) or a DMARD.

In another embodiment, the invention provides a method of treating RA in a subject comprising administering to the subject an effective amount of an antibody of this invention. In this method, preferably the antibody induces a major clinical response in the subject. More preferably, the subject has been treated with a medicament for the disorder, preferably with a TNF antagonist (such as an anti-TNF antibody or a TNF receptor-Ig such as etanercept) or a DMARD. In another preferred aspect of this method, the antibody is

administered no more than about once every other week, more preferably about once a month, to the subject.

In another embodiment of this RA treatment method, a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, is administered to the subject being treated for RA in an effective amount to treat the subject. Such second medicament is preferably an
5 immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker, a BAFF antagonist, a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), an integrin antagonist, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), a cytokine antagonist, or a combination thereof. Additionally, it may be a hyaluronidase glycoprotein as an active delivery vehicle.
10 Most preferably it is a DMARD or methotrexate. Preferably, the antibody used for treating RA is administered subcutaneously or intravenously. Further it may be a naked antibody or conjugated, *e.g.*, to a cytotoxic agent. In another preferred aspect of this method, the antibody is administered no more than about once every other week, more preferably about once a month, to the subject.

15 The invention also provides a composition comprising the antibody of any of the preceding embodiments and a carrier, such as a pharmaceutically acceptable carrier.

Another aspect of the invention is an isolated nucleic acid encoding an antibody of any one of the preceding embodiments. Expression vectors comprising such nucleic acid, and those encoding the antibodies of the invention, are also provided. Also provided is a host
20 cell comprising a nucleic acid encoding an antibody of the invention. Any of a variety of host cells can be used. In one embodiment, the host cell is a prokaryotic cell, for example, *E. coli*. In another embodiment, the host cell is a eukaryotic cell, for example a yeast cell or mammalian cell such as a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell.

In another aspect, the invention provides methods for making an antibody of the
25 invention. For example, the invention provides a method of making or producing an anti-LT α antibody (which, as defined herein includes full length and fragments thereof, provided they contain an Fc region), said method comprising culturing a suitable host cell comprising a nucleic acid encoding an antibody of the invention (preferably comprising a recombinant vector of the invention encoding said antibody (or fragment thereof)), under conditions to
30 produce the antibody, and recovering said antibody. The antibody may be recovered from the host cell or host cell culture. In a preferred embodiment, the antibody is a naked antibody. In another preferred embodiment, the antibody is conjugated with another molecule, the other molecule preferably being a cytotoxic agent.

Still another aspect of the invention is an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody of any of the preceding embodiments and a package insert indicating that the composition can be used to treat the indication the antibody is intended for, such as an autoimmune disorder. A second medicament, as noted above, may be added to such article, for example, in a separate container, in addition to the antibody, which is the first medicament.

In a further aspect, the invention encompasses a hybridoma deposited at the ATCC on April 19, 2006 under Deposit No. PTA-7538. Further provided is an antibody secreted by such a hybridoma.

If the autoimmune disease is RA specifically, one aspect is a method wherein the patient has never been previously administered a medicament for the RA. An alternative aspect is a method wherein the patient has been previously administered at least one medicament for the RA, more preferably wherein the patient was not responsive to at least one medicament that was previously administered. The previously administered medicament or medicaments to which the patient may be non-responsive include an immunosuppressive agent, cytokine antagonist, integrin antagonist, corticosteroid, analgesic, DMARD, NSAID, or CD20 antagonist, and more preferably an immunosuppressive agent, cytokine antagonist, integrin antagonist, corticosteroid, DMARD, NSAID, or CD20 antagonist, such as a CD20 antibody, which is preferably not rituximab or a humanized 2H7. Most preferably, such previously administered medicament(s) are a DMARD or a TNF inhibitor such as anti-TNF-alpha antibody or TNF-Ig.

In another preferred aspect of the invention for using the antibodies herein to treat an autoimmune disease such as RA, the patient has exhibited an inadequate response to one or more TNF inhibitors or to one or more DMARDs. More preferably, the RA is early RA or incipient RA.

In another embodiment, a method is provided wherein at least about three months after the administration of the antibody herein to a patient with RA or joint damage, an imaging test is given that measures a reduction in bone or soft tissue joint damage as compared to baseline prior to the administration, and the amount of the antibody administered is effective in achieving a reduction in the joint damage. In a preferred aspect, the test measures a total modified Sharp score. In a preferred aspect, the method further comprises an additional administration to the patient of the antibody herein in an amount effective to

achieve a continued or maintained reduction in joint damage as compared to the effect of a prior administration of the antibody. In a further aspect, the antibody herein is additionally administered to the patient even if there is no clinical improvement in the patient at the time of the testing after a prior administration. The clinical improvement is preferably determined
 5 by assessing the number of tender or swollen joints, conducting a global clinical assessment of the patient, assessing erythrocyte sedimentation rate, assessing the amount of C-reactive protein level, or using composite measures of disease activity.

Preferred second medicaments for treatment of RA and joint damage include an immunosuppressive agent, a DMARD, a pain-control agent, an integrin antagonist, a NSAID,
 10 a cytokine antagonist, a bisphosphonate, an antagonist to a B-cell surface marker such as, for example, BR3-Fc, BR3 antibody, CD20 antibody, CD40 antibody, CD22 antibody, CD23 antibody, or a combination thereof. If the second medicament is a DMARD, preferably it is selected from the group consisting of auranofin, chloroquine, D-penicillamine, injectable gold, oral gold, hydroxychloroquine, sulfasalazine, myocrisin, and methotrexate. If the
 15 second medicament is a NSAID, preferably it is selected from the group consisting of: fenbufen, naprosyn, diclofenac, etodolac, indomethacin, aspirin and ibuprofen. If the second medicament is an immunosuppressive agent, it is preferably selected from the group consisting of etanercept, infliximab, adalimumab, leflunomide, anakinra, azathioprine, and cyclophosphamide. Other groups of preferred second medicaments include anti-alpha4,
 20 etanercept, infliximab, etanercept, adalimumab, kinaret, efalizumab, osteoprotegerin (OPG), anti-receptor activator of NFκB ligand (anti-RANKL), anti-receptor activator of NFκB-Fc (RANK-Fc), pamidronate, alendronate, actonel, zolendronate, clodronate, methotrexate, azulfidine, hydroxychloroquine, doxycycline, leflunomide, sulfasalazine (SSZ), prednisolone, interleukin-1 receptor antagonist, prednisone, or methylprednisolone. Another preferred
 25 group of second medicaments includes infliximab, an infliximab/methotrexate (MTX) combination, MTX, etanercept, a corticosteroid, cyclosporin A, azathioprine, auranofin, hydroxychloroquine (HCQ), combination of prednisolone, MTX, and SSZ, combinations of MTX, SSZ, and HCQ, the combination of cyclophosphamide, azathioprine, and HCQ, and the combination of adalimumab with MTX. More preferably, the corticosteroid is
 30 prednisone, prednisolone, methylprednisolone, hydrocortisone, or dexamethasone. In another preferred embodiment, the second medicament is MTX, which is more preferably administered perorally or parenterally.

In another aspect, the treatment methods herein further comprise re-treating the patient by re-administering an effective amount of the antibody herein to the patient. Preferably, the re-treatment is commenced at at least about 24 weeks after the first administration of the antibody. In another embodiment, a second re-treatment is commenced, and more preferably wherein the second re-treatment is commenced at at least about 24 weeks after the second administration of the antibody. In another embodiment, where the autoimmune disease is RA, joint damage has been reduced after the re-treatment. In an alternative embodiment, no clinical improvement is observed in the patient at the time of the testing after the re-treatment, especially wherein the clinical improvement is determined by assessing the number of tender or swollen joints, conducting a global clinical assessment of the patient, assessing erythrocyte sedimentation rate, assessing the amount of C-reactive protein level, or using composite measures of disease activity.

In another aspect, the invention herein provides a method for advertising an antibody herein or a pharmaceutically acceptable composition thereof comprising promoting, to a target audience, the use of the antibody or pharmaceutical composition thereof for treating a patient or patient population exhibiting an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or an IBD.

In another aspect, the invention provides an article of manufacture comprising, packaged together, a pharmaceutical composition comprising an antibody herein and a pharmaceutically acceptable carrier and a label stating that the antibody or pharmaceutical composition is indicated for treating patients with an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or an IBD. In a preferred embodiment, the article further comprises a container comprising a second medicament, wherein the antibody herein is a first medicament, further comprising instructions on the package insert for treating the patient with an effective amount of the second medicament, which is preferably methotrexate.

In a still further aspect, the invention provides a method for packaging an antibody herein or a pharmaceutical composition of the antibody comprising combining in a package the antibody or pharmaceutical composition and a label stating that the antibody or pharmaceutical composition is indicated for treating patients exhibiting an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or an IBD.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1A depicts the full-length sequences for the 2C8 chimera light and heavy chains (SEQ ID NOS:32 and 33, respectively).

5 FIG. 1B depicts the full-length sequences for the 3F12 chimera light and heavy chains (SEQ ID NOS:34 and 35, respectively), as well as the 3F12 chimera heavy-chain variable region (SEQ ID NO:31).

10 FIG. 1C depicts the sequence of the light-chain variable region for an improved 3F12 chimera (referred to as chimera2 in the examples below) (3F12.2D3) (SEQ ID NO:36) and the sequence of the light-chain constant region of 3F12.2D3 (SEQ ID NO:37). The bold type of the residues indicates those identified from various chemical/enzymatic cleavages.

15 FIG. 1D depicts the sequence of the heavy-chain variable region for an improved 3F12 chimera (3F12.2D3) (SEQ ID NO:38) and the sequence of the heavy-chain constant region of 3F12.2D3 (SEQ ID NO:39). The bold type of the residues indicates those identified from various chemical/enzymatic cleavages, and the asterisk indicates a glycosylation site.

20 FIG. 2A depicts alignment of sequences of the variable light chain for the following: chimeric 2C8 antibody (SEQ ID NO:23), humanized 2C8.v2 (SEQ ID NO: 24), and human kappa subgroup I consensus sequence (SEQ ID NO:40). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

25 FIG. 2B depicts alignment of sequences of the variable heavy chain for the following: chimeric 2C8 antibody (SEQ ID NO:25), humanized 2C8.v2 (SEQ ID NO:26), and human subgroup III consensus sequence (SEQ ID NO:41). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 2C depicts the light- and heavy-chain sequences for versions 2C8.v7 and 2C8.v12 (SEQ ID NOS:42-45).

30 FIG. 3A depicts alignment of sequences of the variable light chain for the following: chimeric 3F12 antibody (SEQ ID NO:27), humanized 3F12.v5 (SEQ ID NO:28), and human kappa subgroup I consensus sequence (SEQ ID NO:40). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 3B depicts alignment of sequences of the variable heavy chain for the following: original chimeric 3F12 antibody (not 3F12.2D3) (SEQ ID NO:29), humanized 3F12.v5 (SEQ ID NO:30), and human subgroup III consensus sequence (SEQ ID NO:41). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 4A and 4B show that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 inhibits antibody-induced arthritis (AIA). Figure 4A shows the results of preventative use of the anti-LT α antibody versus a Fc DANA mutation (anti-LT.Fcmutant) and a TNFRII.Fc mutant (a TNFR.Ig immunoadhesin) as well as a control isotype (anti-ragweed IgG2a monoclonal antibody). Figure 4B shows that the anti-LT α antibody inhibited development of arthritis in an AIA model when administered therapeutically, versus control isotype and TNFRII.Fc mutant.

FIG. 5A and 5B show that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 inhibits collagen-induced arthritis (CIA). Figure 5A shows that S5H3 inhibited arthritis in a CIA-preventative model, versus a Fc DANA mutation (anti-LT.Fc mutant) as well as a control isotype (anti-ragweed IgG2a monoclonal antibody) and was comparable to a TNFRII.Fc mutant. Figure 5B shows that the S5H3 anti-LT α antibody inhibited development of arthritis in a CIA model when administered therapeutically, versus control isotype, and was comparable to the TNFRII.Fc mutant.

FIG. 6 shows that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 delays onset and severity of EAE disease in MBP-TCR transgenic mice, versus a control isotype (anti-gp120 IgG1 monoclonal antibody).

FIG. 7A, 7B, and 7C show that treatment with hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 does not affect the T-cell-dependent anti-TNP IgM, IgG1, and IgG2a responses, respectively, as compared to isotype control (anti-ragweed), anti-LT.Fc mutant, and CTLA4.Fc (a positive control).

FIG. 8 shows that treatment with hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 does not affect T-cell-independent antibody (IgM, IgG1, IgG2a, and IgG3) responses relative to isotype control (anti-ragweed) and TNFRII.Fc mutant.

FIG. 9 shows that anti-LT α chimeric monoclonal antibody 2C8 prevents GVHD in human SCID mice as compared to the DANA anti-LT α 2C8 Fc mutant and the isotype control (trastuzumab, human IgG1). CTLA4.Fc mutant was also used as a positive control.

FIG. 10A shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 bind to human LT α 3.

FIG. 10B shows that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 as well as anti-LT.Fc mutant bind to murine LT α 3.

5 FIG. 11A shows through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results that hamster-murine chimeric anti-LT α S5H3 antibody binds to murine LT α 1 β 2 complex, as does the anti-LT.Fc mutant.

FIG. 11B shows FACS assay results for binding of chimeric anti-LT α antibodies 3F12 and 2C8 to the LT α on the surface of human cells complexed with LT β . They are
10 compared to LT β -receptor.huIgG1 and isotype control huIgG1 (trastuzumab).

FIG. 11C shows FACS assay results for binding of hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 to the LT α on the surface of murine cells complexed with LT β . It is compared to LT β -receptor murine IgG2a, anti-LT S5H3 Fc mutant, and isotype control (anti-IL122 muIgG2a).

15 FIG. 12A and 12B show that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 bind to human Th1 and Th2 cells, respectively, and show binding results of LTbR.Fc, TNFRII.Fc, and isotype control for comparison.

FIG. 12C-12E show that anti-LT α humanized antibody 2C8.vX does not bind to resting cells (FIG. 12C), but does bind to human Th1 and Th17 cells (FIG. 12D and E,
20 respectively), with a comparison of its binding with that of isotype control.

FIG. 13A shows unactivated T cells treated with LTbR.Fc (solid line), chimeric anti-LT α 3F12 antibody (dashed line), and isotype control (shaded area).

FIG. 13B shows anti-CD3- and anti-CD28-activated CD4 T cells treated with the reagents of Fig. 13A.

25 FIG. 13C shows anti-CD3- and anti-CD28-activated CD8 T cells treated with the reagents of Fig. 13A.

FIG. 13D shows IL15-activated CD56 NK cells treated with the reagents of Fig. 13A.

FIG. 13E shows IgM- and CD40L-activated CD19 B cells treated with the reagents of Fig. 13A.

30 FIG. 14A shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 functionally block human LT α 3 versus the isotype control (trastuzumab).

FIG. 14B shows that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 and the anti-LT.Fc mutant functionally block murine LT α 3 versus the isotype control (trastuzumab).

FIG. 14C shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 block LT α 3-induced IL-8 in A549 cells versus the isotype control (trastuzumab).

FIG. 14D shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12, as well as TNFRII.Fc mutant, block LT α 3-induced ICAM expression on HUVEC versus isotype control (trastuzumab). The response of unstimulated cells is also shown.

FIG. 14E shows that chimeric anti-LT α antibody 2C8 blocks LT α 3-induced NF κ B activation, versus the isotype control. The response of unstimulated cells is also shown.

FIG. 15A shows that chimeric anti-LT α antibody 2C8 functionally blocks LT α 1 β 2-induced NF κ B activation versus the isotype control. The response of unstimulated cells is also shown.

FIG. 15B, 15C, and 15D show that chimeric anti-LT α antibody 2C8 blocks, respectively, LT α 3-, LT α 2 β 1-, and LT α 1 β 2-induced cytotoxicity.

FIG. 15E shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 block LT α 1 β 2-induced ICAM expression on HUVEC, versus the isotype control. The response of unstimulated cells is also shown.

FIG. 16 shows that chimeric anti-LT α antibody 2C8 can kill LT α β -expressing cells, versus anti-LT α 2C8 Fc mutant.

FIG. 17A-H show that chimeric anti-LT α antibody 2C8 blocks cytokine and chemokine secretion in HUVEC cells, with Figures 17A-17D respectively showing KC/IL-8, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 1 β 2, and Figures 17E-17H respectively showing KC/IL-8, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 3 versus control.

FIG. 17I-P show that hamster-murine chimeric anti-LT α antibody S5H3 blocks cytokine and chemokine secretion in 3T3 cells, with Figures 17I-17L respectively showing KC, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 1 β 2, and Figures 17M-17P respectively showing KC, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 3 versus control.

FIG. 18A depicts alignment of sequences of the variable light chain for the following: chimeric 2C8 antibody (SEQ ID NO:23), humanized 2C8.vX (SEQ ID NO:102), and human kappa subgroup I consensus sequence (SEQ ID NO:40). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 18B depicts alignment of sequences of the variable heavy chain for the following: chimeric 2C8 antibody (SEQ ID NO:25), humanized 2C8.vX (SEQ ID NO:103), and human subgroup III consensus sequence (SEQ ID NO:41). The CDR sequences of each

are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 19A and 19B show, respectively, ELISAs of LT α 3 and LT α 1 β 2 binding of 2C8.vX antibodies in comparison to TNFRIL.Fc/isotype control.

FIG. 20A and 20B show, respectively, blocking of human LT α 3 and LT α 1 β 2 by 2C8.vX antibodies in comparison to isotype control/TNFRIL.Fc using an assay for testing blocking of human LT-induced cytotoxicity.

FIG. 21 provides a comparison of how various molecules blocked LT α 3 in a functional assay showing inhibition of ICAM1 upregulation by LT α 3 on HUVEC cells.

Specifically, isotype, 2C8.vX and TNFRIL.Fc were compared.

FIG. 22 provides a comparison of how various molecules blocked LT α 1 β 2 in a functional assay showing LT α 1 β 2 blocking using 293-LT β R cells. Specifically, isotype and 2C8.vX were compared along with unstimulated cells.

FIG. 23 shows ADCC activity of 2C8.vX using a protocol involving 293-LT α 1 β 2 cells. 2C8.vX was compared with the 2C8.vX DANA mutant (Fc mutant) and isotype control.

FIG. 24 shows GVHD survival results with 2C8.vX and CTLA4-Fc, as compared to controls (2C8.vX DANA Fc mutant and isotype control), in a human SCID model.

FIG. 25A-D show that the 2C8.vX antibody depletes LT α 1 β 2-expressing T and B cells in the human SCID GVHD model. The results in FIG. 25A show total positive human cells at day 2 for isotype control, 2C8.vX, and 2C8.vX.DANA mutant. FIG. 25B-D show the results of gating using the CD4, CD8, and CD19 antibodies, respectively.

FIG. 26A depicts alignment of sequences of the variable light chain for the following: chimeric 3F12 antibody (SEQ ID NO:27), humanized 3F12.v14 (SEQ ID NO:108), and human kappa subgroup I consensus sequence (SEQ ID NO:40). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 26B depicts alignment of sequences of the variable heavy chain for the following: chimeric 3F12 antibody (SEQ ID NO:29), humanized 3F12.v14 (SEQ ID NO:109), and human subgroup III consensus sequence (SEQ ID NO:41). The CDR sequences of each are shown in brackets, and asterisks are used to show differences among the aligned sequence amino acid residues.

FIG. 27 shows ADCC activity of 2C8.vX and its afucosylated counterpart, wherein AF = afucosylated antibody and WT = regular CHO cell-line production antibody.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

General Techniques

5 The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook *et al.*, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, and periodic updates); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, ed., 1994); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (Perbal Bernard V., 1988); *Phage Display: A Laboratory Manual* (Barbas *et al.*, 2001).

Definitions

15 "Lymphotoxin- α or "LT α " is defined herein as a biologically active polypeptide having the amino acid sequence shown in FIG. 2A of US Pat. No. 5,824,509. LT α is defined to specifically exclude human TNF α or its natural animal analogues (Pennica *et al.*, *Nature* 312:20/27 : 724-729 (1984) and Aggarwal *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 2345-2354 (1985)). LT α is defined to specifically exclude human LT β as defined, for example, in US 5,661,004.

20 "Lymphotoxin- α 3 trimer" or "LT α 3" refers to a homotrimer of LT α monomers. This homotrimer is anchored to the cell surface by the LT β , transmembrane and cytoplasmic domains.

"Lymphotoxin- $\alpha\beta$ " or "LT $\alpha\beta$ " or "LT $\alpha\beta$ complex" refers to a heterotrimer of LT α with LT β . These heterotrimers contain either two subunits of LT α and one subunit of LT β (LT α 2 β 1), or one subunit of LT α and two of LT β (LT α 1 β 2).

"Tumor necrosis factor receptor-I" or "TNFR I" and "tumor necrosis factor receptor-II" or "TNFR II" refer to cell-surface TNF receptors for the LT α 3 homotrimer, also known as p55 and p75, respectively.

30 "Lymphotoxin- β receptor" or "LT β -R" refers to the receptor to which the LT $\alpha\beta$ heterotrimers bind.

"Regulatory cytokines" are cytokines the abnormal levels of which indicate the presence of an autoimmune disorder in a patient. Such cytokines include, for example, interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-

15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, BLyS/April, TGF- α , TGF- β , interferon- α (IFN- α), IFN- β , IFN- γ , MIP-1, MIF, MCP-1, M-CSF or G-CSF, a lymphotoxin, LIGHT, 4-1BB ligand, CD27 ligand, CD30 ligand, CD40 ligand, Fas ligand, GITR ligand, OX40 ligand, RNAK ligand, THANK, TRAIL, TWEAK and VEG1. This group includes TNF family members, which include but are not limited to, TNF- α , LTs such as LT α , LT β , and LIGHT. For a review of the TNF superfamily, see MacEwan, *Br. J. Pharmacology* 135: 855-875 (2002). Preferably, the regulatory cytokine is an IL such as IL-1b or IL-6 and/or a TNF family member.

"Inflammatory cytokines associated with rheumatoid arthritis" refer to IL-6, IL-1b, and TNF α , associated with RA pathology, which can be inhibited systemically and or in the joints in an *in vitro* collagen-induced arthritis assay.

"LT $\alpha\beta$ -expressing cells" are cells that express or secrete the LT $\alpha\beta$ heterotrimers.

The expression "modulates LT $\alpha\beta$ -expressing cells" refers to depleting or altering proteins made by the cells such as cytokines, chemokines, or growth factors, with the cells including, for example, monocytes, dendritic cells, T cells, and B cells.

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably in the broadest sense and include monoclonal antibodies (*e.g.*, full-length or intact monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multivalent antibodies, and multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity), and may also include certain antibody fragments (as described in greater detail herein). An antibody can be chimeric, human, humanized, and/or affinity matured.

"Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the portion preferably retains at least one, more preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody. In one embodiment, an antibody fragment comprises an antigen-binding site of the intact antibody and thus retains the ability to bind antigen. In another embodiment, an antibody fragment, for example one that comprises the Fc region, retains at least one of the biological functions normally associated with the Fc region when present in an intact antibody, such as FcRn binding, antibody half-life modulation, ADCC function, and complement binding. In one embodiment, an antibody fragment is a monovalent antibody that has an *in vivo* half life substantially similar to an intact antibody. For example, such an antibody fragment may comprise an antigen binding arm linked to an Fc sequence capable of conferring *in vivo* stability to the fragment. In one embodiment, an antibody of the invention is a one-armed

antibody as described in WO 2005/063816, for example, an antibody comprising Fc mutations constituting "knobs" and "holes". For example, a hole mutation can be one or more of T366A, L368A and/or Y407V in an Fc polypeptide, and a cavity mutation can be T366W. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; 5 diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

For the purposes herein, an "intact antibody" is one comprising heavy and light variable domains as well as an Fc region.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a 10 population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), 15 each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies useful in the present invention may be prepared by the hybridoma 20 methodology first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made using recombinant DNA methods in, e.g., bacterial, non-animal eukaryotic, animal, or plant cells (see, e.g., US 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in, e.g., Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

25 The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or 30 belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (US 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Methods of making chimeric antibodies are known in the art.

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are

5 human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a CDR of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv FR residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are found neither

10 in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and maximize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a

15 human immunoglobulin sequence, although the FR regions may include one or more amino acid substitutions that improve binding affinity. The number of these amino acid substitutions in the FR is typically no more than six in the H chain, and no more than three in the L chain. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further

20 details, see Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). See also Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem.Soc.Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994). The humanized antibody includes a PRIMATIZED[®] antibody wherein the

25 antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by, e.g., immunizing macaque monkeys with the antigen of interest. Methods of making humanized antibodies are known in the art.

A "human antibody" is one that possesses an amino acid sequence that corresponds to that of an antibody produced by a human and/or has been made using any of the techniques

30 for making human antibodies as disclosed herein. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues. Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage-display libraries. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et*

al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Also available for the preparation of human monoclonal antibodies are methods described in Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991).

An "affinity-matured" antibody is an antibody with one or more alterations in one or
 5 more CDRs thereof that result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody that does not possess those alteration(s). Preferred affinity matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity-matured antibodies are produced by procedures known in the art. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain
 10 shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

An "antigen" is a predetermined antigen to which an antibody can selectively bind.
 15 The target antigen may be polypeptide, carbohydrate, nucleic acid, lipid, hapten, or another naturally occurring or synthetic compound. Preferably, the target antigen is a polypeptide. An "acceptor human framework" for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a VL or VH framework derived from a human immunoglobulin framework, or from a human consensus framework. An acceptor human framework "derived
 20 from" a human immunoglobulin framework or human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or may contain pre-existing amino acid sequence changes. Where pre-existing amino acid changes are present, preferably no more than five, and more preferably four or less, and still more preferably three or less, pre-existing amino acid changes are present. Where pre-existing amino acid changes are present in a VH,
 25 preferably those changes are only at three, two, or one of positions 71, 73, and 78; for instance, the histidine residues at those positions may be alanine residues. In one embodiment, the VL acceptor human framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

A "human consensus framework" is a framework that represents the most commonly occurring amino acid residue in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Typically, this subgroup of sequences is a

5 subgroup as in Kabat *et al.*, *supra*. In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat *et al.*, *supra*. In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat *et al.*, *supra*.

A "VH subgroup III consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable heavy subgroup III of Kabat *et al.*, *supra*.

10 In one embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46)-H1-WVRQAPGKGLEWVG
(SEQ ID NO:47)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:48)-
H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:49), where N is any amino acid residue.

15 In another embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46)-H1-
WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:47)-H2-
RATFSADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAD (SEQ ID NO:50)-H3-
20 WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:49), where N is any amino acid residue.

A "VL subgroup I consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable light kappa subgroup I of Kabat *et al.*, *supra*. In one embodiment, the VL subgroup I consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences:

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:51)-L1-WYQQKPGKAPKLQTY (SEQ ID
NO:52)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 53)-L3-
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54).

In another embodiment, the VL subgroup I consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences:

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:51)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID
NO:55)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53)-L3-
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54).

The term “complementarity-determining region”, or “CDR”, when used herein refers to the regions of an antibody variable domain that are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops. Generally, antibodies comprise six hypervariable regions; three in the VH (H1, H2, H3), and three in the VL (L1, L2, L3). A number of CDR delineations are in use and are encompassed herein. The Kabat CDRs are based on sequence variability and are the most commonly used (Kabat *et al.*, *supra*). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). The AbM hypervariable regions represent a compromise between the Kabat CDRs and Chothia structural loops, and are used by Oxford Molecular’s AbM antibody modeling software. The “contact” hypervariable regions are based on an analysis of the available complex crystal structures. The residues from each of these hypervariable regions are noted below.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
----	-----	---	-----	-----
15 L1	L24-L34	L24-L34	L24-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat Numbering)				
20 H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia Numbering)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

CDRs may comprise “extended CDRs” as follows: 24-36 or 24-34 (L1), 46-56 or 50-56 (L2), and 89-97 (L3) in the VL, and 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2), and 93-102, 94-102, or 95-102 (H3) in the VH. The variable domain residues are numbered according to Kabat *et al.*, *supra*, for each of these definitions. Throughout the present specification and claims, the numbering of the residues in an immunoglobulin heavy chain is that of the EU index as in Kabat *et al.*, *supra*. The “EU index as in Kabat” refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody.

An “unmodified human framework” is a human framework that has the same amino acid sequence as the acceptor human framework, *e.g.* lacking human to non-human amino acid substitution(s) in the acceptor human framework.

An "altered CDR" for the purposes herein is a CDR comprising one or more (*e.g.* one to about 16) amino acid substitution(s) therein.

An "un-modified CDR" for the purposes herein is a CDR having the same amino acid sequence as a non-human antibody from which it was derived, *i.e.* one lacking one or more amino acid substitutions.

"Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the CDR residues as herein defined.

A "blocking" antibody or an "antagonist" antibody is one that inhibits or reduces biological activity of the antigen it binds. Preferred blocking antibodies or antagonist antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

An "agonist antibody", as used herein, is an antibody that mimics at least one of the functional activities of a polypeptide of interest.

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 nonproteinaceous solutes. 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 to more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The term "variable-domain residue numbering as in Kabat" or "amino acid position numbering as in Kabat", and variations thereof, refers to the numbering system used for heavy-chain variable domains or light-chain variable domains of the compilation of antibodies in Kabat *et al., supra*. Using this numbering system, the actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids corresponding to a shortening of, or insertion into, a FR or CDR of the variable domain. For example, a heavy-chain variable domain may include a single amino acid insert (residue 52a according to Kabat) after residue 52 of H2 and inserted residues (*e.g.* residues 82a, 82b, and 82c, *etc* according to Kabat) after heavy-chain FR residue 82. The Kabat numbering of residues may be determined for a given

antibody by alignment at regions of homology of the sequence of the antibody with a "standard" Kabat-numbered sequence.

A "parent polypeptide" is a polypeptide comprising an amino acid sequence that lacks one or more of the Fc-region modifications disclosed herein and that differs in effector function compared to a polypeptide variant as herein disclosed. The parent polypeptide may comprise a native-sequence Fc region or an Fc region with pre-existing amino acid sequence modifications (such as additions, deletions, and/or substitutions).

The term "Fc region" is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain. The "Fc region" may be a native-sequence Fc region or a variant Fc region. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy-chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The Fc region of an immunoglobulin generally comprises two constant domains, CH2 and CH3. The last residue, lysine, in the heavy chain of IgG1 can, but does not have to, be present as the terminal residue in the Fc in the mature protein.

The "CH2 domain" of a human IgG Fc region (also referred to as "Cy2" domain) usually extends from about amino acid 231 to about amino acid 340. The CH2 domain is unique in that it is not closely paired with another domain. Rather, two N-linked branched carbohydrate chains are interposed between the two CH2 domains of an intact native IgG molecule. It has been speculated that the carbohydrate may provide a substitute for the domain-domain pairing and help stabilize the CH2 domain. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985).

The "CH3 domain" comprises the stretch of residues C-terminal to a CH2 domain in an Fc region (*i.e.* from about amino acid residue 341 to about amino acid residue 447 of an IgG).

A "functional Fc region" possesses an "effector function" of a native-sequence Fc region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; CDC; Fc receptor binding; ADCC; phagocytosis; down regulation of cell- surface receptors (*e.g.* LT receptor), *etc.* Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (*e.g.* an antibody variable domain) and can be assessed using various assays as herein disclosed, for example.

A "native-sequence Fc region" or "wild-type Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. Native-

sequence human Fc regions are known in the art and include a native-sequence human IgG1 Fc region (non-A and A allotypes); native-sequence human IgG2 Fc region; native-sequence human IgG3 Fc region; and native-sequence human IgG4 Fc region, as well as naturally occurring allelic variants thereof.

5 A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence that differs from that of a native-sequence Fc region by virtue of at least one "amino acid modification" as herein defined. Preferably, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native-sequence Fc region or to the Fc region of a parent polypeptide, *e.g.* from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably from about one to about five amino
10 acid substitutions in a native-sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% homology with a native-sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, more preferably at least about 90% homology therewith, and most preferably at least about 95% homology therewith.

15 The term "Fc region-containing polypeptide" refers to a polypeptide, such as an antibody or immunoadhesin (see definitions herein), which comprises an Fc region.

The terms "Fc receptor" and "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an IgG antibody. The preferred FcR is a native-sequence human FcR. In one embodiment, the FcR is a FcγR that includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an
25 immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain (see review in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). The term includes allotypes, such as FcγRIIA allotypes: FcγRIIA-Phe158, FcγRIIA-Val158, FcγRIIA-R131, and/or FcγRIIA-H131. FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*,
30 126:330-341 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2429-2434 (1994)).

“Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” or “ADCC” refers to a form of cytotoxicity in which secreted Ig bound onto Fc receptors (FcRs) present on certain cytotoxic cells (e.g. Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) enable these cytotoxic effector cells to bind specifically to an antigen-bearing target cell and subsequently kill the target cell with cytotoxins. The antibodies “arm” the cytotoxic cells and are absolutely required for such killing. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII, and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and NK cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

“Human effector cells” are leukocytes that express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes that mediate ADCC include PBMCs, NK cells, monocytes, cytotoxic T cells, and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, e.g. from blood or PBMCs as described herein.

“Complement-dependent cytotoxicity” or “CDC” refers to the lysis of a target cell in the presence of complement. Activation of the classical complement pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to antibodies (of the appropriate subclass) that are bound to their cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

A polypeptide with a variant IgG Fc having “altered” FcR binding affinity or ADCC activity is one that has either enhanced or diminished FcR binding activity (FcγR or FcRn) and/or ADCC activity compared to a parent polypeptide or to a polypeptide comprising a native-sequence Fc region. The variant Fc that “exhibits increased binding” to an FcR binds at least one FcR with better affinity than the parent polypeptide. The improvement in binding compared to a parent polypeptide may be about three-fold, preferably about 5-, 10-, 25-, 50-, 60-, 100-, 150-, 200-, and up to 500-fold, or about 25% to 1000% improvement in binding.

The polypeptide variant that "exhibits decreased binding" to an FcR binds at least one FcR with less affinity than a parent polypeptide. The decrease in binding compared to a parent polypeptide may be about 40% or more decrease in binding. Such Fc variants that display decreased binding to an FcR may possess little or no appreciable binding to an FcR, *e.g.*,
5 about 0-20% binding to the FcR compared to a native-sequence IgG Fc region.

The polypeptide having a variant Fc that binds an FcR with "better affinity" or "higher affinity" than a polypeptide or parent polypeptide having wild-type or native-sequence IgG Fc is one that binds any one or more of the above identified FcRs with substantially better binding affinity than the parent polypeptide with native-sequence Fc,
10 when the amounts of polypeptide with variant Fc and parent polypeptide in the binding assay are essentially the same. For example, the variant Fc polypeptide with improved FcR binding affinity may display from about two-fold to about 300-fold, preferably, from about three-fold to about 170-fold, improvement in FcR binding affinity compared to the parent polypeptide, where FcR binding affinity is determined as known in the art.

The polypeptide comprising a variant Fc region that "exhibits increased ADCC" or mediates ADCC in the presence of human effector cells more effectively than a polypeptide having wild-type IgG Fc is one that *in vitro* or *in vivo* is substantially more effective at mediating ADCC, when the amounts of polypeptide with variant Fc region and the polypeptide with wild-type Fc region used in the assay are essentially the same. Generally,
20 such variants will be identified using the *in vitro* ADCC assay as herein disclosed, but other assays or methods for determining ADCC activity, *e.g.* in an animal model, *etc.*, are contemplated. The preferred variant is from about five-fold to about 100-fold, more preferably from about 25- to about 50-fold, more effective at mediating ADCC than the wild-type Fc.

25 An "amino acid modification" refers to a change in the amino acid sequence of a predetermined amino acid sequence. Exemplary modifications include an amino acid substitution, insertion, and/or deletion. The preferred amino acid modification herein is a substitution.

An "amino acid modification at" a specified position, *e.g.* of the Fc region, refers to the substitution or deletion of the specified residue, or the insertion of at least one amino acid
30 residue adjacent to the specified residue. By insertion "adjacent to" a specified residue is meant insertion within one to two residues thereof. The insertion may be N-terminal or C-terminal to the specified residue.

An "amino acid substitution" refers to the replacement of at least one existing amino acid residue in a predetermined amino acid sequence with another different "replacement" amino acid residue. The replacement residue or residues may be "naturally occurring amino acid residues" (*i.e.*, encoded by the genetic code) and selected from the group consisting of:

5 alanine (Ala); arginine (Arg); asparagine (Asn); aspartic acid (Asp); cysteine (Cys); glutamine (Gln); glutamic acid (Glu); glycine (Gly); histidine (His); isoleucine (Ile); leucine (Leu); lysine (Lys); methionine (Met); phenylalanine (Phe); proline (Pro); serine (Ser); threonine (Thr); tryptophan (Trp); tyrosine (Tyr); and valine (Val). Preferably, the replacement residue is not cysteine. Substitution with one or more non-naturally occurring

10 amino acid residues is also encompassed by the definition of an amino acid substitution herein. A "non-naturally occurring amino acid residue" refers to a residue, other than those naturally occurring amino acid residues listed above, which is able to covalently bind adjacent amino acid residues(s) in a polypeptide chain. Examples of non-naturally occurring amino acid residues include norleucine, ornithine, norvaline, homoserine, and other amino

15 acid residue analogues such as those described in Ellman *et al.*, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991). For generation of such non-naturally occurring amino acid residues, the procedures of Noren *et al.*, *Science* 244:182 (1989) and Ellman *et al.*, *supra*, can be used. Briefly, these procedures involve chemically activating a suppressor tRNA with a non-naturally occurring amino acid residue followed by *in vitro* transcription and translation of the RNA.

20 The term "conservative" amino acid substitution as used within this invention is meant to refer to amino acid substitutions that substitute functionally equivalent amino acids. Conservative amino acid changes result in silent changes in the amino acid sequence of the resulting polypeptide. For example, one or more amino acids of a similar polarity act as functional equivalents and result in a silent alteration within the amino acid sequence of the

25 polypeptide. In general, substitutions within a group may be considered conservative with respect to structure and function. However, the skilled artisan will recognize that the role of a particular residue is determined by its context within the three-dimensional structure of the molecule in which it occurs. For example, Cys residues may occur in the oxidized (disulfide) form, which is less polar than the reduced (thiol) form. The long aliphatic portion of the Arg

30 side chain may constitute a critical feature of its structural or functional role, and this may be best conserved by substitution of a nonpolar, rather than another basic, residue. Also, it will be recognized that side chains containing aromatic groups (Trp, Tyr, and Phe) can participate in ionic-aromatic or "cation-pi" interactions. In these cases, substitution of one of these side

chains with a member of the acidic or uncharged polar group may be conservative with respect to structure and function. Residues such as Pro, Gly, and Cys (disulfide form) can have direct effects on the main-chain conformation, and often may not be substituted without structural distortions.

5 An "amino acid insertion" refers to the incorporation of at least one amino acid into a predetermined amino acid sequence. While the insertion will usually consist of the insertion of one or two amino acid residues, the present application contemplates larger "peptide insertions", *e.g.*, insertion of about three to about five or even up to about ten amino acid residues. The inserted residue(s) may be naturally occurring or non-naturally occurring as
10 disclosed above.

An "amino acid deletion" refers to the removal of at least one amino acid residue from a predetermined amino acid sequence.

Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (in A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New
15 York (1975)):

(1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acidic: Asp (D), Glu (E)

(4) basic: Lys (K), Arg (R), His(H)

20 Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

25 (4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

The "hinge region" is generally defined as stretching from Glu216 to Pro230 of human IgG1 (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Hinge regions of other IgG
30 isotypes may be aligned with the IgG1 sequence by placing the first and last cysteine residues forming inter-heavy chain S-S bonds in the same positions.

The "lower hinge region" of an Fc region is normally defined as the stretch of residues immediately C-terminal to the hinge region, *i.e.*, residues 233 to 239 of the Fc region.

"C1q" is a polypeptide that includes a binding site for the Fc region of an immunoglobulin. C1q together with two serine proteases, C1r and C1s, forms the complex C1, the first component of the CDC pathway. Human C1q can be purchased commercially from, *e.g.* Quidel, San Diego, CA.

5 The term "binding domain" refers to the region of a polypeptide that binds to another molecule. In the case of an FcR, the binding domain can comprise a portion of a polypeptide chain thereof (*e.g.*, the α chain thereof) that is responsible for binding an Fc region. One useful binding domain is the extracellular domain of an FcR α chain.

10 "Functional fragments" of the antibodies of the invention comprise a portion of an intact antibody, generally including the antigen-binding or variable region of the intact antibody or the Fc region of an antibody that retains FcR binding capability. Examples of antibody fragments include linear antibodies, single-chain antibody molecules, and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules that
15 combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity that is other than the antigen-recognition and binding site of an antibody (*i.e.*, is "heterologous"), and an immunoglobulin constant-domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin
20 molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant-domain sequence in the immunoadhesin can be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD, or IgM. For example, useful immunoadhesins as second medicaments herein include polypeptides that comprise the B-
25 lymphocyte stimulator (BLyS) binding portions of a BLyS receptor without the transmembrane or cytoplasmic sequences of the BLyS receptor. In one embodiment, the extracellular domain of BR3 (BLyS receptor 3), TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor), or BCMA (B-cell maturation antigen) is fused to a constant domain of an immunoglobulin sequence.

30 A "fusion protein" and a "fusion polypeptide" refer to a polypeptide having two portions covalently linked together, where each of the portions is a polypeptide having a different property. The property may be a biological property, such as activity *in vitro* or *in vivo*. The property may also be a simple chemical or physical property, such as binding to a

target molecule, catalysis of a reaction, *etc.* The two portions may be linked directly by a single peptide bond or through a peptide linker containing one or more amino acid residues. Generally, the two portions and the linker will be in reading frame with each other.

“Binding affinity” generally refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions between a single binding site of a molecule (*e.g.*, an antibody) and its binding partner (*e.g.*, an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, “binding affinity” refers to intrinsic binding affinity that reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (*e.g.*, antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the dissociation constant (K_d). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Low-affinity antibodies generally bind antigen slowly and tend to dissociate readily, whereas high-affinity antibodies generally bind antigen faster and tend to remain bound longer. A variety of methods of measuring binding affinity are known in the art, any of which can be used for purposes of the present invention. Specific illustrative embodiments are described in the following.

An “on-rate” or “rate of association” or “association rate” or “ k_{on} ” according to this invention can be determined with the surface plasmon resonance technique using a BIACORE®-2000 or a BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) optical biosensor at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N*’-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier’s instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5ug/ml (~0.2 μ M) before injection at a flow rate of 5 μ l/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of 1M ethanolamine to block unreacted groups, for kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% TWEEN™ 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 μ l/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIACORE® Evaluation Software version 3.2™) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, *e.g.*, Chen *et al.*, *J. Mol Biol* 293:865-881 (1999). However, if the on-rate exceeds $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in

fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20 nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-AMINCO™ spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

The “Kd” or “Kd value” according to this invention is, in one embodiment, measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of the antibody and antigen molecule as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (¹²⁵I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (Chen *et al.*, *J. Mol Biol* 293:865-881 (1999)). To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynex) are coated overnight with 5 µg/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbent plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [¹²⁵I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (consistent with assessment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (*e.g.*, 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature for one hour. The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% TWEEN™-20 in PBS. When the plates have dried, 150 µl/well of scintillant (MicroScint-20; Packard) is added, and the plates are counted on a TOPCOUNT™ gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays.

The phrase “substantially similar” or “substantially the same,” as used herein, denotes a sufficiently high degree of similarity between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of little or no biological and/or statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (*e.g.*, Kd values). The difference between said two values is preferably less than about 50%, more preferably less than about 40%, still more preferably less than about 30%, even more preferably less than about 20%, and most

preferably less than about 10% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

The phrase "substantially reduced," or "substantially different," as used herein, denotes a sufficiently high degree of difference between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (*e.g.*, K_d values, HAMA response). The difference between said two values is preferably greater than about 10%, more preferably greater than about 20%, still more preferably greater than about 30%, even more preferably greater than about 40%, and most preferably greater than about 50% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

"Percent (%) amino acid sequence identity" and "homology" with respect to a peptide or polypeptide sequence are defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific peptide or polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, or MEGALIGNTM (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, authored by Genentech, Inc. The source code of ALIGN-2 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given

amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

5 100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of
10 amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described herein using the ALIGN-2 computer program.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with an antibody or
15 method of the invention, regardless of mechanism, but including inhibiting or blocking the action of $LT\alpha 3$ or $LT\alpha\beta$ and/or by depleting $LT\alpha$ -positive cells. This condition includes, but is not limited to, a medical condition or illness mediated by or related to elevated expression or activity, or abnormal activation, of $LT\alpha 3$ and/or $LT\alpha\beta$ by any cell. This includes chronic and acute disorders such as those pathological conditions that predispose the mammal to the
20 disorder in question.

An "autoimmune disorder" herein is a disease or disorder arising from and directed against an individual's own tissues or organs or a co-segregate or manifestation thereof or resulting condition therefrom. In many of these autoimmune and inflammatory disorders, a number of clinical and laboratory markers may exist, including, but not limited to,
25 hypergammaglobulinemia, high levels of autoantibodies, antigen-antibody complex deposits in tissues, benefit from corticosteroid or immunosuppressive treatments, and lymphoid cell aggregates in affected tissues. Without being limited to any one theory regarding B-cell mediated autoimmune disorder, it is believed that B cells demonstrate a pathogenic effect in human autoimmune diseases through a multitude of mechanistic pathways, including
30 autoantibody production, immune complex formation, dendritic and T-cell activation, cytokine synthesis, direct chemokine release, and providing a nidus for ectopic neolymphogenesis. Each of these pathways may participate to different degrees in the pathology of autoimmune diseases.

As used herein, an "autoimmune disorder" can be an organ-specific disease (*i.e.*, the immune response is specifically directed against an organ system such as the endocrine system, the hematopoietic system, the skin, the cardiopulmonary system, the gastrointestinal and liver systems, the renal system, the thyroid, the ears, the neuromuscular system, the central nervous system, *etc.*) or a systemic disease that can affect multiple organ systems (for example, systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, polymyositis, *etc.*). Preferred such diseases include autoimmune rheumatologic disorders (such as, for example, rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, scleroderma, lupus such as SLE and lupus nephritis, polymyositis/dermatomyositis, cryoglobulinemia, anti-phospholipid antibody syndrome, and psoriatic arthritis), autoimmune gastrointestinal and liver disorders (such as, for example, inflammatory bowel diseases (e.g., ulcerative colitis and Crohn's disease), autoimmune gastritis and pernicious anemia, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and celiac disease), vasculitis (such as, for example, ANCA-negative vasculitis and ANCA-associated vasculitis, including Churg-Strauss vasculitis, Wegener's granulomatosis, and microscopic polyangiitis), autoimmune neurological disorders (such as, for example, multiple sclerosis (MS), opsoclonus myoclonus syndrome, myasthenia gravis, neuromyelitis optica, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and autoimmune polyneuropathies), renal disorders (such as, for example, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, and Berger's disease), autoimmune dermatologic disorders (such as, for example, psoriasis, urticaria, hives, pemphigus vulgaris, bullous pemphigoid, and cutaneous lupus erythematosus), hematologic disorders (such as, for example, thrombocytopenic purpura, thrombotic thrombocytopenic purpura, post-transfusion purpura, and autoimmune hemolytic anemia), atherosclerosis, uveitis, autoimmune hearing diseases (such as, for example, inner ear disease and hearing loss), Behcet's disease, Raynaud's syndrome, organ transplant, and autoimmune endocrine disorders (such as, for example, diabetic-related autoimmune diseases such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), Addison's disease, and autoimmune thyroid disease (*e.g.*, Graves' disease and thyroiditis)). More preferred such diseases include, for example, RA, IBD, including Crohn's disease and ulcerative colitis, ANCA-associated vasculitis, lupus, MS, Sjögren's syndrome, Graves' disease, IDDM, pernicious anemia, thyroiditis, and glomerulonephritis. Still more preferred are RA, IBD, lupus, and MS, and more preferred RA and IBD, and most preferred RA.

Specific examples of other autoimmune disorders as defined herein, which in some cases encompass those listed above, include, but are not limited to, arthritis (acute and

chronic, rheumatoid arthritis including juvenile-onset rheumatoid arthritis and stages such as rheumatoid synovitis, gout or gouty arthritis, acute immunological arthritis, chronic inflammatory arthritis, degenerative arthritis, type II collagen-induced arthritis, infectious arthritis, Lyme arthritis, proliferative arthritis, psoriatic arthritis, Still's disease, vertebral arthritis, osteoarthritis, arthritis chronica progrediente, arthritis deformans, polyarthritis chronica primaria, reactive arthritis, menopausal arthritis, estrogen-depletion arthritis, and ankylosing spondylitis/rheumatoid spondylitis), autoimmune lymphoproliferative disease, inflammatory hyperproliferative skin diseases, psoriasis such as plaque psoriasis, guttate psoriasis, pustular psoriasis, and psoriasis of the nails, atopy including atopic diseases such as hay fever and Job's syndrome, dermatitis including contact dermatitis, chronic contact dermatitis, exfoliative dermatitis, allergic dermatitis, allergic contact dermatitis, hives, dermatitis herpetiformis, nummular dermatitis, seborrheic dermatitis, non-specific dermatitis, primary irritant contact dermatitis, and atopic dermatitis, x-linked hyper IgM syndrome, allergic intraocular inflammatory diseases, urticaria such as chronic allergic urticaria and chronic idiopathic urticaria, including chronic autoimmune urticaria, myositis, polymyositis/dermatomyositis, juvenile dermatomyositis, toxic epidermal necrolysis, scleroderma (including systemic scleroderma), sclerosis such as systemic sclerosis, multiple sclerosis (MS) such as spino-optical MS, primary progressive MS (PPMS), and relapsing remitting MS (RRMS), progressive systemic sclerosis, atherosclerosis, arteriosclerosis, sclerosis disseminata, ataxic sclerosis, neuromyelitis optica (NMO), inflammatory bowel disease (IBD) (for example, Crohn's disease, autoimmune-mediated gastrointestinal diseases, gastrointestinal inflammation, colitis such as ulcerative colitis, colitis ulcerosa, microscopic colitis, collagenous colitis, colitis polyposa, necrotizing enterocolitis, and transmural colitis, and autoimmune inflammatory bowel disease), bowel inflammation, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum, primary sclerosing cholangitis, respiratory distress syndrome, including adult or acute respiratory distress syndrome (ARDS), meningitis, inflammation of all or part of the uvea, iritis, choroiditis, an autoimmune hematological disorder, graft-versus-host disease, angioedema such as hereditary angioedema, cranial nerve damage as in meningitis, herpes gestationis, pemphigoid gestationis, pruritis scroti, autoimmune premature ovarian failure, sudden hearing loss due to an autoimmune condition, IgE-mediated diseases such as anaphylaxis and allergic and atopic rhinitis, encephalitis such as Rasmussen's encephalitis and limbic and/or brainstem encephalitis, uveitis, such as anterior uveitis, acute anterior uveitis, granulomatous uveitis, nongranulomatous uveitis, phacoantigenic uveitis, posterior

uveitis, or autoimmune uveitis, glomerulonephritis (GN) with and without nephrotic syndrome such as chronic or acute glomerulonephritis such as primary GN, immune-mediated GN, membranous GN (membranous nephropathy), idiopathic membranous GN or idiopathic membranous nephropathy, membrano- or membranous proliferative GN (MPGN),
5 including Type I and Type II, and rapidly progressive GN (RPGN), proliferative nephritis, autoimmune polyglandular endocrine failure, balanitis including balanitis circumscripta plasmacellularis, balanoposthitis, erythema annulare centrifugum, erythema dyschromicum perstans, eythema multiform, granuloma annulare, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, lamellar ichthyosis,
10 epidermolytic hyperkeratosis, premalignant keratosis, pyoderma gangrenosum, allergic conditions and responses, food allergies, drug allergies, insect allergies, rare allergic disorders such as mastocytosis, allergic reaction, eczema including allergic or atopic eczema, asteatotic eczema, dyshidrotic eczema, and vesicular palmoplantar eczema, asthma such as asthma bronchiale, bronchial asthma, and auto-immune asthma, conditions involving
15 infiltration of T cells and chronic inflammatory responses, immune reactions against foreign antigens such as fetal A-B-O blood groups during pregnancy, chronic pulmonary inflammatory disease, autoimmune myocarditis, leukocyte adhesion deficiency, lupus, including lupus nephritis, lupus cerebritis, pediatric lupus, non-renal lupus, extra-renal lupus, discoid lupus and discoid lupus erythematosus, alopecia lupus, SLE, such as cutaneous SLE
20 or subacute cutaneous SLE, neonatal lupus syndrome (NLE), and lupus erythematosus disseminatus, juvenile onset (Type I) diabetes mellitus, including pediatric IDDM, adult onset diabetes mellitus (Type II diabetes), autoimmune diabetes, idiopathic diabetes insipidus, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic colitis, diabetic large-artery disorder, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines
25 and T-lymphocytes, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis including lymphomatoid granulomatosis, agranulocytosis, vasculitides (including large-vessel vasculitis such as polymyalgia rheumatica and giant-cell (Takayasu's) arteritis, medium-vessel vasculitis such as Kawasaki's disease and polyarteritis nodosa/periarteritis nodosa, immunovascularitis, CNS vasculitis, cutaneous vasculitis, hypersensitivity vasculitis, necrotizing vasculitis such as
30 fibrinoid necrotizing vasculitis and systemic necrotizing vasculitis, ANCA-negative vasculitis, and ANCA-associated vasculitis such as Churg-Strauss syndrome (CSS), Wegener's granulomatosis, and microscopic polyangiitis), temporal arteritis, aplastic anemia, autoimmune aplastic anemia, Coombs positive anemia, Diamond Blackfan anemia, hemolytic

anemia or immune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia (AIHA),
 pernicious anemia (anemia perniciosa), Addison's disease, pure red cell anemia or aplasia
 (PRCA), Factor VIII deficiency, hemophilia A, autoimmune neutropenia(s), cytopenias such
 as pancytopenia, leukopenia, diseases involving leukocyte diapedesis, CNS inflammatory
 5 disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple organ injury syndrome such as
 those secondary to septicemia, trauma or hemorrhage, antigen-antibody complex- mediated
 diseases, anti-glomerular basement membrane disease, anti-phospholipid antibody syndrome,
 motoneuritis, allergic neuritis, Behçet's disease/syndrome, Castleman's syndrome,
 Goodpasture's syndrome, Reynaud's syndrome, Sjögren's syndrome, Stevens-Johnson
 10 syndrome, pemphigoid or pemphigus such as pemphigoid bullous, cicatricial (mucous
 membrane) pemphigoid, skin pemphigoid, pemphigus vulgaris, paraneoplastic pemphigus,
 pemphigus foliaceus, pemphigus mucus-membrane pemphigoid, and pemphigus
 erythematosus, epidermolysis bullosa acquisita, ocular inflammation, preferably allergic
 ocular inflammation such as allergic conjunctivitis, linear IgA bullous disease, autoimmune-
 15 induced conjunctival inflammation, autoimmune polyendocrinopathies, Reiter's disease or
 syndrome, thermal injury due to an autoimmune condition, preeclampsia, an immune
 complex disorder such as immune complex nephritis, antibody-mediated nephritis,
 neuroinflammatory disorders, polyneuropathies, chronic neuropathy such as IgM
 polyneuropathies or IgM-mediated neuropathy, thrombocytopenia (as developed by
 20 myocardial infarction patients, for example), including thrombotic thrombocytopenic purpura
 (TTP), post-transfusion purpura (PTP), heparin-induced thrombocytopenia, and autoimmune
 or immune-mediated thrombocytopenia including, for example, idiopathic thrombocytopenic
 purpura (ITP) including chronic or acute ITP, scleritis such as idiopathic cerato-scleritis,
 episcleritis, autoimmune disease of the testis and ovary including autoimmune orchitis and
 25 oophoritis, primary hypothyroidism, hypoparathyroidism, autoimmune endocrine diseases
 including thyroiditis such as autoimmune thyroiditis, Hashimoto's disease, chronic thyroiditis
 (Hashimoto's thyroiditis), or subacute thyroiditis, autoimmune thyroid disease, idiopathic
 hypothyroidism, Grave's disease, Grave's eye disease (ophthalmopathy or thyroid-associated
 ophthalmopathy), polyglandular syndromes such as autoimmune polyglandular syndromes,
 30 for example, type I (or polyglandular endocrinopathy syndromes), paraneoplastic syndromes,
 including neurologic paraneoplastic syndromes such as Lambert-Eaton myasthenic syndrome
 or Eaton-Lambert syndrome, stiff-man or stiff-person syndrome, encephalomyelitis such as
 allergic encephalomyelitis or encephalomyelitis allergica and experimental allergic

encephalomyelitis (EAE), myasthenia gravis such as thymoma-associated myasthenia gravis, cerebellar degeneration, neuromyotonia, opsoclonus or opsoclonus myoclonus syndrome (OMS), and sensory neuropathy, multifocal motor neuropathy, Sheehan's syndrome, autoimmune hepatitis, chronic hepatitis, lupoid hepatitis, giant-cell hepatitis, chronic active hepatitis or autoimmune chronic active hepatitis, pneumonitis such as lymphoid interstitial pneumonitis (LIP), bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs. NSIP, Guillain-Barré syndrome, Berger's disease (IgA nephropathy), idiopathic IgA nephropathy, linear IgA dermatosis, acute febrile neutrophilic dermatosis, subcorneal pustular dermatosis, transient acantholytic dermatosis, cirrhosis such as primary biliary cirrhosis and pneumonocirrhosis, autoimmune enteropathy syndrome, Celiac or Coeliac disease, celiac sprue (gluten enteropathy), refractory sprue, idiopathic sprue, cryoglobulinemia such as mixed cryoglobulinemia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease), coronary artery disease, autoimmune ear disease such as autoimmune inner ear disease (AIED), autoimmune hearing loss, polychondritis such as refractory or relapsed or relapsing polychondritis, pulmonary alveolar proteinosis, keratitis such as Cogan's syndrome/nonsyphilitic interstitial keratitis, Bell's palsy, Sweet's disease/syndrome, rosacea autoimmune, zoster-associated pain, amyloidosis, a non-cancerous lymphocytosis, a primary lymphocytosis, which includes monoclonal B cell lymphocytosis (e.g., benign monoclonal gammopathy and monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), peripheral neuropathy, paraneoplastic syndrome, channelopathies such as epilepsy, migraine, arrhythmia, muscular disorders, deafness, blindness, periodic paralysis, and channelopathies of the CNS, autism, inflammatory myopathy, focal or segmental or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), endocrine ophthalmopathy, uveoretinitis, chorioretinitis, autoimmune hepatological disorder, fibromyalgia, multiple endocrine failure, Schmidt's syndrome, adrenalitis, gastric atrophy, presenile dementia, demyelinating diseases such as autoimmune demyelinating diseases and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Dressler's syndrome, alopecia areata, alopecia totalis, CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia), male and female autoimmune infertility, e.g., due to anti-spermatozoan antibodies, mixed connective tissue disease, Chagas' disease, rheumatic fever, recurrent abortion, farmer's lung, erythema multiforme, post-cardiotomy syndrome, Cushing's syndrome, bird-fancier's lung, allergic granulomatous angiitis, benign lymphocytic angiitis, Alport's syndrome, alveolitis such as allergic alveolitis and fibrosing alveolitis, interstitial

lung disease, transfusion reaction, leprosy, malaria, parasitic diseases such as leishmaniasis, kypanosomiasis, schistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, Sampter's syndrome, Caplan's syndrome, dengue, endocarditis, endomyocardial fibrosis, diffuse interstitial pulmonary fibrosis, interstitial lung fibrosis, fibrosing mediastinitis, pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, endophthalmitis, erythema elevatum et diutinum, erythroblastosis fetalis, eosinophilic faciitis, Shulman's syndrome, Felty's syndrome, flariasis, cyclitis such as chronic cyclitis, heterochronic cyclitis, iridocyclitis (acute or chronic), or Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein purpura, human immunodeficiency virus (HIV) infection, SCID, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), echovirus infection, sepsis (systemic inflammatory response syndrome (SIRS)), endotoxemia, pancreatitis, thyroxicosis, parvovirus infection, rubella virus infection, post-vaccination syndromes, congenital rubella infection, Epstein-Barr virus infection, mumps, Evan's syndrome, autoimmune gonadal failure, Sydenham's chorea, post-streptococcal nephritis, thromboangitis obliterans, thyrotoxicosis, tabes dorsalis, chorioiditis, giant-cell polymyalgia, chronic hypersensitivity pneumonitis, conjunctivitis, such as vernal catarrh, keratoconjunctivitis sicca, and epidemic keratoconjunctivitis, idiopathic nephritic syndrome, minimal change nephropathy, benign familial and ischemia-reperfusion injury, transplant organ reperfusion, retinal autoimmunity, joint inflammation, bronchitis, chronic obstructive airway/pulmonary disease, silicosis, aphthae, aphthous stomatitis, arteriosclerotic disorders (cerebral vascular insufficiency) such as arteriosclerotic encephalopathy and arteriosclerotic retinopathy, aspermiogenesis, autoimmune hemolysis, Boeck's disease, cryoglobulinemia, Dupuytren's contracture, endophthalmia phacoanaphylactica, enteritis allergica, erythema nodosum leprosum, idiopathic facial paralysis, chronic fatigue syndrome, febris rheumatica, Hamman-Rich's disease, sensorineural hearing loss, haemoglobinuria paroxysmatica, hypogonadism, ileitis regionalis, leucopenia, mononucleosis infectiosa, transverse myelitis, primary idiopathic myxedema, nephrosis, ophthalmia sympathica (sympathetic ophthalmitis), neonatal ophthalmitis, optic neuritis, orchitis granulomatosa, pancreatitis, polyradiculitis acuta, pyoderma gangrenosum, Quervain's thyroiditis, acquired splenic atrophy, non-malignant thymoma, lymphofollicular thymitis, vitiligo, toxic-shock syndrome, food poisoning, conditions involving infiltration of T cells, leukocyte-adhesion deficiency, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, diseases involving leukocyte diapedesis, multiple organ injury syndrome, antigen-antibody complex-mediated diseases, antiglomerular basement membrane disease,

autoimmune polyendocrinopathies, oophoritis, primary myxedema, autoimmune atrophic gastritis, rheumatic diseases, mixed connective tissue disease, nephrotic syndrome, insulinitis, polyendocrine failure, autoimmune polyglandular syndromes, including polyglandular syndrome type I, adult-onset idiopathic hypoparathyroidism (AOIH), cardiomyopathy such as

5 dilated cardiomyopathy, epidermolysis bullosa acquisita (EBA), hemochromatosis, myocarditis, nephrotic syndrome, primary sclerosing cholangitis, purulent or nonpurulent sinusitis, acute or chronic sinusitis, ethmoid, frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis, allergic sinusitis, an eosinophil-related disorder such as eosinophilia, pulmonary infiltration

10 eosinophilia, eosinophilia-myalgia syndrome, Löffler's syndrome, chronic eosinophilic pneumonia, tropical pulmonary eosinophilia, bronchopneumonic aspergillosis, aspergilloma, or granulomas containing eosinophils, anaphylaxis, spondyloarthropathies, seronegative spondyloarthritides, polyendocrine autoimmune disease, sclerosing cholangitis, sclera, episclera, chronic mucocutaneous candidiasis, Bruton's syndrome, transient

15 hypogammaglobulinemia of infancy, Wiskott-Aldrich syndrome, ataxia telangiectasia syndrome, angiectasis, autoimmune disorders associated with collagen disease, rheumatism such as chronic arthrorheumatism, lymphadenitis, reduction in blood pressure response, vascular dysfunction, tissue injury, cardiovascular ischemia, hyperalgesia, renal ischemia, cerebral ischemia, and disease accompanying vascularization, allergic hypersensitivity disorders, glomerulonephritides, reperfusion injury, ischemic re-perfusion disorder,

20 reperfusion injury of myocardial or other tissues, lymphomatous tracheobronchitis, inflammatory dermatoses, dermatoses with acute inflammatory components, multiple organ failure, bullous diseases, renal cortical necrosis, acute purulent meningitis or other central nervous system inflammatory disorders, ocular and orbital inflammatory disorders, granulocyte transfusion-associated syndromes, cytokine-induced toxicity, narcolepsy, acute

25 serious inflammation, chronic intractable inflammation, pyelitis, endarterial hyperplasia, peptic ulcer, valvulitis, and endometriosis.

As used herein, "rheumatoid arthritis" or "RA" refers to a recognized disease state that may be diagnosed according to the 2000 revised American Rheumatoid Association criteria for the classification of RA, or any similar criteria, and includes active, early, and incipient

30 RA, as defined below. Physiological indicators of RA include symmetric joint swelling, which is characteristic though not invariable in rheumatoid arthritis. Fusiform swelling of the proximal interphalangeal (PIP) joints of the hands as well as metacarpophalangeal (MCP), wrists, elbows, knees, ankles, and metatarsophalangeal (MTP) joints are commonly affected

and swelling is easily detected. Pain on passive motion is the most sensitive test for joint inflammation, and inflammation and structural deformity often limit the range of motion for the affected joint. Typical visible changes include ulnar deviation of the fingers at the MCP joints, hyperextension, or hyperflexion of the MCP and PIP joints, flexion contractures of the elbows, and subluxation of the carpal bones and toes. The subject with RA may be resistant to DMARDs, in that the DMARDs are not effective or fully effective in treating symptoms. Further candidates for therapy according to this invention include those who have experienced an inadequate response to previous or current treatment with TNF inhibitors such as etanercept, infliximab, and/or adalimumab because of toxicity or inadequate efficacy (for example, etanercept for 3 months at 25 mg twice a week or at least 4 infusions of infliximab at 3 mg/kg).

A patient with "active rheumatoid arthritis" means a patient with active and not latent symptoms of RA. Subjects with "early active rheumatoid arthritis" are those subjects with active RA diagnosed for at least eight weeks but no longer than four years, according to the revised 1987 ACR criteria for the classification of RA. Subjects with "early rheumatoid arthritis" are those subjects with RA diagnosed for at least eight weeks but no longer than four years, according to the revised 1987 ACR criteria for classification of RA. Early RA includes, for example, juvenile-onset RA, juvenile idiopathic arthritis (JIA), or juvenile RA (JRA).

Patients with "incipient RA" have early polyarthritis that does not fully meet ACR criteria for a diagnosis of RA, but is associated with the presence of RA-specific prognostic biomarkers such as anti-CCP and shared epitope. They include patients with positive anti-CCP antibodies who present with polyarthritis, but do not yet have a diagnosis of RA, and are at high risk for going on to develop *bona fide* ACR criteria RA (95% probability).

"Joint damage" is used in the broadest sense and refers to damage or partial or complete destruction to any part of one or more joints, including the connective tissue and cartilage, where damage includes structural and/or functional damage of any cause, and may or may not cause joint pain/arthralgia. It includes, without limitation, joint damage associated with or resulting from inflammatory joint disease as well as non-inflammatory joint disease. This damage may be caused by any condition, such as an autoimmune disease, especially arthritis, and most especially RA. Exemplary such conditions include acute and chronic arthritis, RA including juvenile-onset RA, juvenile idiopathic arthritis (JIA), or juvenile RA (JRA), and stages such as rheumatoid synovitis, gout or gouty arthritis, acute immunological

arthritis, chronic inflammatory arthritis, degenerative arthritis, type II collagen-induced arthritis, infectious arthritis, septic arthritis, Lyme arthritis, proliferative arthritis, psoriatic arthritis, Still's disease, vertebral arthritis, osteoarthritis, arthritis chronica progrediente, arthritis deformans, polyarthritis chronica primaria, reactive arthritis, menopausal arthritis, estrogen-depletion arthritis, and ankylosing spondylitis/rheumatoid spondylitis), rheumatic
 5 autoimmune disease other than RA, and significant systemic involvement secondary to RA (including but not limited to vasculitis, pulmonary fibrosis or Felty's syndrome). For purposes herein, joints are points of contact between elements of a skeleton (of a vertebrate such as an animal) with the parts that surround and support it and include, but are not limited
 10 to, for example, hips, joints between the vertebrae of the spine, joints between the spine and pelvis (sacroiliac joints), joints where the tendons and ligaments attach to bones, joints between the ribs and spine, shoulders, knees, feet, elbows, hands, fingers, ankles, and toes, but especially joints in the hands and feet.

As used herein, "treatment" refers to clinical intervention in an attempt to alter the
 15 natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishing of any direct or indirect pathological consequences of the disease, prevention of metastasis, decreasing of the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state,
 20 and remission or improved prognosis. In some embodiments, the antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder. A subject is successfully "treated" for example, for an autoimmune disorder if, after receiving a therapeutic amount of an antibody of the invention according to the methods of the present invention, the subject shows observable and/or measurable reduction in or absence of one or more signs and symptoms of
 25 the particular disease.

In one preferred embodiment of successful treatment, the antibody induces a major clinical response in a subject with RA. For purposes herein, a "major clinical response" is defined as achieving an American College of Rheumatology 70 response (ACR 70) for six consecutive months. ACR response scores are categorized as ACR 20, ACR 50, and ACR 70,
 30 with ACR 70 being the highest level of sign and symptom control in this evaluation system. ACR response scores measure improvement in RA disease activity, including joint swelling and tenderness, pain, level of disability, and overall patient and physician assessment. An

example of a different type of antibody that induces a major clinical response as recognized by the FDA and as defined herein is etanercept (ENBREL®).

An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

5 A "therapeutically effective amount" of a medicament herein may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the medicament, *e.g.*, antibody, to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the drug in question, *e.g.*, antibody, are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, 10 to achieve the desired prophylactic result. Typically but not necessarily, 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.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or 15 prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.* At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, and toxins such as small-molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof.

20 A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepea and cyclophosphamide (CYTOXAN®); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, 25 triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-aminocamptothecin); 30 bryostatin; callistatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; CDP323, an oral alpha-4 integrin

inhibitor; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, 5 fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (*e. g.*, calicheamicin, especially calicheamicin gammaII and calicheamicin omegaII (see, *e.g.*, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromophores); other antibiotics such as 10 aclacinomycin, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycin, cactinomycin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection (DOXIL®), and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, 15 marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, and zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate, gemcitabine (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabine (XELODA®), an epothilone, and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as 20 denopterin, methotrexate, pteropterin, and trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, and thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; and folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; 25 eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR); 30 razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C");

thiotepa; taxoids, *e.g.*, paclitaxel (TAXOL®), albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (ABRAXANE™), and doxorubicin (DOXIL®); chlorambucil; 6-thioguanine; mercaptopurine; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovorin; vinorelbine (NAVELBINE®); novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovorin.

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), raloxifene (EVISTA®), droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (FARESTON®); anti-progesterones; estrogen receptor down-regulators (ERDs); estrogen receptor antagonists such as fulvestrant (FASLODEX®); agents that function to suppress or shut down the ovaries, for example, leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as leuprolide acetate (LUPRON® and ELIGARD®), goserelin acetate, buserelin acetate and triptorelin; anti-androgens such as flutamide, nilutamide and bicalutamide; and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, megestrol acetate (MEGASE®), exemestane (AROMASIN®), formestane, fadrozole, vorozole (RIVISOR®), letrozole (FEMARA®), and anastrozole (ARIMIDEX®). In addition, such definition of chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), etidronate (DIDROCAL®), NE-58095, zoledronic acid/zoledronate (ZOMETA®), alendronate (FOSAMAX®), pamidronate (AREDIA®), tiludronate (SKELID®), or risedronate (ACTONEL®); as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in

signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; topoisomerase 1 inhibitor (*e.g.*,
 5 LURTOTECAN®); rrmh (*e.g.*, ABARELIX®); lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016); and pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of the above.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population that act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines,
 10 monokines, interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, and IL-15, including PROLEUKIN® rIL-2, a TNF such as TNF- α or TNF- β , and other polypeptide factors including leukocyte-inhibitory factor (LIF) and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence cytokines, including
 15 synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof. A "cytokine antagonist" is a molecule that inhibits or antagonizes such cytokines by any mechanism, including, for example, antibodies to the cytokine, antibodies to the cytokine receptor, and immunoadhesins.

For purposes herein, "tumor necrosis factor alpha" or "TNF-alpha" or "TNF α " refers
 20 to a human TNF-alpha molecule comprising the amino acid sequence as described in Pennica *et al.*, *Nature*, 312:721 (1984) or Aggarwal *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:2345 (1985).

A "TNF antagonist" or "TNF inhibitor" is defined herein as a molecule that decreases, blocks, inhibits, abrogates, or otherwise interferes with TNF α activity *in vitro*, *in situ*, and/or preferably *in vivo*. Such an agent inhibits, to some extent, a biological function of TNF-
 25 alpha, generally through binding to TNF-alpha and neutralizing its activity. A suitable TNF antagonist can also decrease block, abrogate, interfere, prevent and/or inhibit TNF RNA, DNA, or protein synthesis, TNF α release, TNF α receptor signaling, membrane TNF α cleavage, TNF α activity, and TNF α production and/or synthesis. Such TNF antagonists include, but are not limited to, anti-TNF α antibodies, antigen-binding fragments thereof,
 30 specified mutants or domains thereof that bind specifically to TNF α that, upon binding to TNF α , destroy or deplete cells expressing the TNF α in a mammal and/or interfere with one or more functions of those cells, a soluble TNF receptor (*e.g.*, p55, p70 or p85) or fragment, fusion polypeptides thereof, a small-molecule TNF antagonist, *e.g.*, TNF binding protein I or

II (TBP-I or TBP-II), nerelimonmab, CDP-571, infliximab (REMICADE®), etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA™), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, and the like), antigen-binding fragments thereof, and receptor molecules that bind specifically to TNF α , compounds that prevent and/or inhibit TNF α synthesis, TNF α release, or its action on target cells, such as thalidomide, tenidap, phosphodiesterase inhibitors (*e.g.*, pentoxifylline and rolipram), A2b adenosine receptor agonists, and A2b adenosine receptor enhancers, compounds that prevent and/or inhibit TNF α receptor signaling, such as mitogen-activated protein (MAP) kinase inhibitors, compounds that block and/or inhibit membrane TNF α cleavage, such as metalloproteinase inhibitors, compounds that block and/or inhibit TNF α activity, such as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (*e.g.*, captopril), and compounds that block and/or inhibit TNF α production and/or synthesis, such as MAP kinase inhibitors. The preferred antagonist comprises an antibody or an immunoadhesin. Examples of TNF antagonists specifically contemplated herein are etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®), and adalimumab (HUMIRA™).

The term "hormone" refers to polypeptide hormones, which are generally secreted by glandular organs with ducts. Included among the hormones are, for example, growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; estradiol; hormone-replacement therapy; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitioestanol, mepitioestane, or testolactone; prorelaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); prolactin, placental lactogen, mouse gonadotropin-associated peptide, gonadotropin-releasing hormone; inhibin; activin; mullerian-inhibiting substance; and thrombopoietin. As used herein, the term hormone includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence hormone, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

The term "growth factor" refers to proteins that promote growth, and include, for example, hepatic growth factor; fibroblast growth factor; vascular endothelial growth factor; nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-derived growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- α , - β , and - γ ; and colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF), granulocyte-macrophage-CSF

(GM-CSF), and granulocyte-CSF (G-CSF). As used herein, the term growth factor includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence growth factor, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

5 The term "integrin" refers to a receptor protein that allows cells both to bind to and to respond to the extracellular matrix and is involved in a variety of cellular functions such as wound healing, cell differentiation, homing of tumor cells, and apoptosis. They are part of a large family of cell adhesion receptors that are involved in cell-extracellular matrix and cell-cell interactions. Functional integrins consist of two transmembrane glycoprotein subunits, 10 called alpha and beta, that are non-covalently bound. The alpha subunits all share some homology to each other, as do the beta subunits. The receptors always contain one alpha chain and one beta chain. Examples include Alpha6beta1, Alpha3beta1, Alpha7beta1, LFA-1, *etc.* As used herein, the term "integrin" includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence integrin, 15 including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

 An "integrin antagonist" is a molecule that inhibits or antagonizes such integrins by any mechanism, including, for example, antibodies to the integrin. Examples of "integrin antagonists or antibodies" herein include an LFA-1 antibody, such as efalizumab 20 (RAPTIVA®) commercially available from Genentech, or other CD11/11a and CD18 antibodies, or an alpha 4 integrin antibody such as natalizumab (ANTEGREN®) available from Biogen, or diazacyclic phenylalanine derivatives (WO 2003/89410), phenylalanine derivatives (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 and WO 2003/53926), phenylpropionic acid derivatives (WO 2003/10135), enamine derivatives (WO 2001/79173), 25 propanoic acid derivatives (WO 2000/37444), alkanolic acid derivatives (WO 2000/32575), substituted phenyl derivatives (US 6,677,339 and 6,348,463), aromatic amine derivatives (US 6,369,229), ADAM disintegrin domain polypeptides (US 2002/0042368), antibodies to alphavbeta3 integrin (EP 633945), aza-bridged bicyclic amino acid derivatives (WO 2002/02556), *etc.*

30 "Corticosteroid" refers to any one of several synthetic or naturally occurring substances with the general chemical structure of steroids that mimic or augment the effects of the naturally occurring corticosteroids. Examples of synthetic corticosteroids include prednisone, prednisolone (including methylprednisolone, such as SOLU-MEDROL®

methylprednisolone sodium succinate), dexamethasone or dexamethasone triamcinolone, hydrocortisone, and betamethasone. The preferred corticosteroids herein are prednisone, methylprednisolone, hydrocortisone, or dexamethasone.

The term "immunosuppressive agent" as used herein for adjunct therapy refers to substances that act to suppress or mask the immune system of the mammal being treated herein. This would include substances that suppress cytokine production, down-regulate or suppress self-antigen expression, or mask the MHC antigens. Examples of such agents include 2-amino-6-aryl-5-substituted pyrimidines (see US 4,665,077); non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoids such as cortisol or aldosterone, anti-inflammatory agents such as a cyclooxygenase inhibitor, a 5-lipoxygenase inhibitor, or a leukotriene receptor antagonist; purine antagonists such as azathioprine or mycophenolate mofetil (MMF); trocade (Ro32-355); a peripheral sigma receptor antagonist such as ISR-31747; alkylating agents such as cyclophosphamide; bromocryptine; danazol; dapsone; glutaraldehyde (which masks the MHC antigens, as described in US 4,120,649); anti-idiotypic antibodies for MHC antigens and MHC fragments; cyclosporin A; steroids such as corticosteroids or glucocorticosteroids or glucocorticoid analogs, *e.g.*, prednisone, methylprednisolone, including SOLU-MEDROL[®] methylprednisolone sodium succinate, rimexolone, and dexamethasone; dihydrofolate reductase inhibitors such as methotrexate (oral or subcutaneous); anti-malarial agents such as chloroquine and hydroxychloroquine; sulfasalazine; leflunomide; cytokine release inhibitors such as SB-210396 and SB-217969 monoclonal antibodies and a MHC II antagonist such as ZD2315; a PG1 receptor antagonist such as ZD4953; a VLA4 adhesion blocker such as ZD7349; anti-cytokine or anti-cytokine receptor antibodies including anti-interferon-alpha, -beta, or -gamma antibodies, anti- TNF-alpha antibodies (infliximab (REMICADE[®]), or adalimumab), anti-TNF-alpha immunoadhesin (etanercept), anti-TNF-beta antibodies, interleukin-1 (IL-1) blockers such as recombinant HuIL-1Ra and IL-1B inhibitor, anti-interleukin-2 (IL-2) antibodies and anti-IL-2 receptor antibodies; IL-2 fusion toxin; anti-L3T4 antibodies; leflunomide; heterologous anti-lymphocyte globulin; OPC-14597; NISV (immune response modifier); an essential fatty acid such as gammalinolenic acid or eicosapentaenoic acid; CD-4 blockers and pan-T antibodies, preferably anti-CD3 or anti-CD4/CD4a antibodies; co-stimulatory modifier (*e.g.*, CTLA4-Fc fusion, also known as ABATACEPT[™]); anti-interleukin-6 (IL-6) receptor antibodies and antagonists; anti-LFA-1 antibodies, including anti-CD11a and anti-CD18 antibodies; soluble peptide containing a LFA-3-binding domain (WO 1990/08187); streptokinase; IL-10;

transforming growth factor-beta (TGF-beta); streptodornase; RNA or DNA from the host; FK506; RS-61443; enlimomab; CDP-855; PNP inhibitor; CH-3298; GW353430; 4162W94, chlorambucil; deoxyspergualin; rapamycin; T-cell receptor (Cohen *et al.*, US 5,114,721); T-cell receptor fragments (Offner *et al.*, *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 1990/11294; 5 Janeway, *Nature*, 341: 482-483 (1989); and WO 91/01133); BAFF antagonists such as BAFF antibodies and BR3 antibodies; zTNF4 antagonists (Mackay and Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002)); biologic agents that interfere with T cell helper signals, such as anti-CD40 receptor or anti-CD40 ligand (CD154), including blocking antibodies to CD40-CD40 ligand (e.g., Durie *et al.*, *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 1470-80 10 (1995)) and CTLA4-Ig (Finck *et al.*, *Science*, 265: 1225-7 (1994)); and T-cell receptor antibodies (EP 340,109) such as T10B9. Some preferred immunosuppressive agents herein include cyclophosphamide, chlorambucil, azathioprine, leflunomide, MMF, or methotrexate.

Examples of "disease-modifying anti-rheumatic drugs" or "DMARDs" include chloroquine, hydroxychloroquine, myocrisin, auranofin, sulfasalazine, methotrexate, 15 leflunomide, etanercept, infliximab (plus oral and subcutaneous methotrexate), azathioprine, D-penicillamine, gold salts (oral), gold salts (intramuscular), minocycline, cyclosporine including cyclosporine A and topical cyclosporine, *staphylococcal* protein A (Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197, (9), p1125-39 (2003)), including salts and derivatives thereof, *etc.*

20 Examples of "non-steroidal anti-inflammatory drugs" or "NSAIDs" include aspirin, acetylsalicylic acid, ibuprofen and ibuprofen retard, fenoprofen, piroxicam, flurbiprofen, naproxen, ketoprofen, naproxen, tenoxicam, benorylate, diclofenac, naproxen, nabumetone, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, diclofenac, fenbufen, azapropazone, acemetacin, tiaprofenic acid, indomethacin, sulindac, tolmetin, phenylbutazone, diclofenac and diclofenac 25 retard, cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors such as GR 253035, MK966, celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl), benzenesulfonamide and valdecoxib (BEXTRA®), and meloxicam (MOBIC®), including salts and derivatives thereof, *etc.* Preferably, they are aspirin, naproxen, ibuprofen, indomethacin, or tolmetin. Such NSAIDs are optionally used with an analgesic such as 30 codenine, tramadol, and/or dihydrocodinine or narcotic such as morphine.

A "B cell" is a lymphocyte that matures within the bone marrow, and includes a naïve B cell, memory B cell, or effector B cell (plasma cells). The B cell herein may be a normal or non-malignant B cell.

The "CD20" antigen, or "CD20," is an about 35-kDa, non-glycosylated phosphoprotein found on the surface of greater than 90% of B cells from peripheral blood or lymphoid organs. CD20 is present on both normal B cells as well as malignant B cells, but is not expressed on stem cells. Other names for CD20 in the literature include "B-lymphocyte-restricted antigen" and "Bp35". The CD20 antigen is described in Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985), for example. The preferred CD20 is non-human primate or human CD20, most preferably human CD20.

The "CD22" antigen, or "CD22," also known as BL-CAM or Lyb8, is a type 1 integral membrane glycoprotein with molecular weight of about 130 (reduced) to 140kD (unreduced). It is expressed in both the cytoplasm and cell membrane of B-lymphocytes. CD22 antigen appears early in B-cell lymphocyte differentiation at approximately the same stage as the CD19 antigen. Unlike other B-cell markers, CD22 membrane expression is limited to the late differentiation stages comprised between mature B cells (CD22+) and plasma cells (CD22-). The CD22 antigen is described, for example, in Wilson *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:137 (1991) and Wilson *et al.*, *J. Immunol.* 150:5013 (1993).

An "antagonist to a B-cell surface marker" is a molecule that, upon binding to a B-cell surface marker, destroys or depletes B cells in a mammal and/or interferes with one or more B-cell functions, *e.g.* by reducing or preventing a humoral response elicited by the B cell. The antagonist preferably is able to deplete B cells (*i.e.* reduce circulating B-cell levels) in a mammal treated therewith. Such depletion may be achieved via various mechanisms such as ADCC and/or CDC, inhibition of B-cell proliferation and/or induction of B-cell death (*e.g.* via apoptosis). Antagonists included within the scope of the present invention include antibodies, synthetic or native-sequence peptides, immunoadhesins, and small-molecule antagonists that bind to a B-cell surface marker, optionally conjugated with or fused to another molecule. The preferred antagonist comprises an antibody or immunoadhesin. It includes BLYS antagonists such as immunoadhesins, and is preferably lumiliximab (anti-CD23), CD20, CD22, or BR3 antibody or BLYS immunoadhesin. The BLYS immunoadhesin preferably is selected from the group consisting of BR3 immunoadhesin comprising the extracellular domain of BR3, TACI immunoadhesin comprising the extracellular domain of TACI, and BCMA immunoadhesin comprising the extracellular domain of BCMA. The most preferred BR3 immunoadhesin is hBR3-Fc of SEQ ID NO:2 of WO 2005/00351 and US 2005/0095243. See also US 2005/0163775 and WO 2006/068867. Another preferred BLYS antagonist is an anti-BLYS antibody, more preferably wherein the anti-BLYS antibody binds

BLyS within a region of BLyS comprising residues 162-275, or an anti-BR3 antibody, more preferably wherein the anti-BR3 antibody binds BR3 in a region comprising residues 23-38 of human BR3.

Examples of CD20 antibodies include: "C2B8," which is now called "rituximab" ("RITUXAN®") (US 5,736,137) and fragments thereof that retain the ability to bind CD20; the yttrium-[90]-labelled 2B8 murine antibody designated "Y2B8" or "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) commercially available from IDEC Pharmaceuticals, Inc. (US 5,736,137; 2B8 deposited with ATCC under accession no. HB11388 on June 22, 1993); murine IgG2a "B1," also called "Tositumomab," optionally labelled with ¹³¹I to generate the "131I-B1" or "iodine I131 tositumomab" antibody (BEXXAR™) commercially available from Corixa (see, also, US 5,595,721); murine monoclonal antibody "1F5" (Press *et al. Blood* 69(2):584-591 (1987) and variants thereof including "framework patched" or humanized 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC deposit HB-96450); murine 2H7 and chimeric 2H7 antibody (US 5,677,180); a humanized 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman *et al.*) and as set forth below); HUMAX-CD20™ fully human, high-affinity antibody targeted at the CD20 molecule in the cell membrane of B-cells (Genmab, Denmark; see, for example, Glennie and van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) and Cragg *et al., Blood* 101: 1045-1052 (2003)); the human monoclonal antibodies set forth in WO 2004/035607 (Teeling *et al.*); AME-133™ antibodies (Applied Molecular Evolution); GA101 (GlycArt; US 2005/0123546); A20 antibody or variants thereof such as chimeric or humanized A20 antibody (cA20, hA20, respectively) (US 2003/0219433, Immunomedics); and monoclonal antibodies L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 or NU-B2 available from the International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al., In: Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). The preferred CD20 antibodies herein are chimeric, humanized, or human CD20 antibodies, more preferably rituximab, a humanized 2H7, chimeric or humanized A20 antibody (Immunomedics), and HUMAX-CD20™ human CD20 antibody (Genmab).

Purely for the purposes herein and unless indicated otherwise, a "humanized 2H7" refers to a humanized CD20 antibody, or an antigen-binding fragment thereof, wherein the antibody is effective to deplete primate B cells *in vivo*. The antibody includes those set forth in US 2006/0062787 and the figures thereof, and including those antibodies the sequences of which are provided in US 2006/0188495. See also US 2006/0034835 and US 2006/0024300. In a summary of various preferred embodiments of the invention, the V region of variants

based on 2H7 version 16 as disclosed in US 2006/0062787 will have the amino acid sequences of v16 except at the positions of amino acid substitutions that are indicated in the table below. Unless otherwise indicated, the 2H7 variants will have the same L chain as that of v16.

2H7 version	Heavy chain (V _H) changes	Light chain (V _L) changes	Fc changes
16			-
A	-	-	S298A, E333A, K334A
B	N100A	M32L	
C	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
D	D56A, N100A	S92A	
E	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
F	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
G	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
H	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
I	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
J	-	-	K334L

The preferred humanized 2H7 is an intact antibody or antibody fragment having the sequence of version 16, or any of the versions shown above.

"BAFF antagonists" herein are any molecules that block the activity of BAFF or BR3. They include immunoadhesins comprising a portion of BR3, TACI, or BCMA that binds BAFF, or variants thereof that bind BAFF. In other embodiments, the BAFF antagonist is a BAFF antibody. A "BAFF antibody" is an antibody that binds BAFF, and preferably binds BAFF within a region of human BAFF comprising residues 162-275 of human BAFF. In another embodiment, the BAFF antagonist is BR3 antibody. A "BR3 antibody" is an antibody that binds BR3, and is preferably one that binds BR3 within a region of human BR3 comprising residues 23-38 of human BR3. The sequences of human BAFF and human BR3 are found, for example, in US 2006/0062787. Other examples of BAFF-binding polypeptides or BAFF antibodies can be found in, e.g., WO 2002/092620, WO 2003/014294, Gordon *et al.*, *Biochemistry* 42(20):5977-5983 (2003), Kelley *et al.*, *J. Biol. Chem.*,279(16):16727-16735 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 and WO 2000/40716.

"Chronic" administration refers to administration of the medicament(s) in a

continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers that are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH-buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low-molecular-weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS™.

The term "mammal" refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, *etc.* Preferably, the mammal herein is human.

A "package insert" refers to instructions customarily included in commercial packages of medicaments that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications, other medicaments to be combined with the packaged product, and/or warnings concerning the use of such medicaments, *etc.*

A "kit" is any manufacture (*e.g.*, a package or container) comprising at least one reagent, *e.g.*, a medicament for treatment of an autoimmune disease such as RA, lupus, MS, or IBD. The manufacture is preferably promoted, distributed, or sold as a unit for performing the methods of the present invention.

A "target audience" is a group of people or an institution to whom or to which a particular medicament is being promoted or intended to be promoted, as by marketing or advertising, especially for particular uses, treatments, or indications, such as individual patients, patient populations, readers of newspapers, medical literature, and magazines, television or internet viewers, radio or internet listeners, physicians, drug companies, *etc.*

A "medicament" is an active drug to treat the disorder in question or its symptoms or side effects.

The term "about" as used herein refers to the usual error range for the respective value readily known to the skilled person in this technical field.

Modes for Carrying Out the Invention

In one embodiment, the invention contemplates an isolated LT α antibody comprising at least one CDR sequence selected from the group consisting of:

- (a) a CDR-L1 sequence comprising amino acids A1-A11, wherein A1-A11 is KASQAVSSAVA (SEQ ID NO:1) or RASQAVSSAVA (SEQ ID NO:2), or comprising amino acids A1-A17, wherein A1-A17 is KSSQSLLYSTNQKNFLA (SEQ ID NO:3) or KSSQSLLYSANQKNFLA (SEQ ID NO:4) or KSSQSLLYSTNQKNALA (SEQ ID NO:6), where N is any amino acid (chimeric 2C8 or humanized 2C8.v2/2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/humanized 3F12.v14, or 3F12 clone 14 or 17, respectively);
- (b) a CDR-L2 sequence comprising amino acids B1-B7, wherein B1-B7 is SASHRYT (SEQ ID NO:7) or WASTRDS (SEQ ID NO:8) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14, respectively);
- (c) a CDR-L3 sequence comprising amino acids C1-C9, wherein C1-C9 is QQHYSTPWT (SEQ ID NO:9) or QENYSTPWT (SEQ ID NO:11) or QQYYSYPRT (SEQ ID NO:13) or QQYASYPRT (SEQ ID NO:14) or QQYYAYPRT (SEQ ID NO:15), where N is any amino acid (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2 or 2C8 clone G7 or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14 or 3F12 clone 20 or 3F12 clone 21, respectively);
- (d) a CDR-H1 sequence comprising amino acids D1-D10, wherein D1-D10 is GYTFTSYVIH (SEQ ID NO:16) or GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:17) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14, respectively);
- (e) a CDR-H2 sequence comprising amino acids E1-E17, wherein E1-E17 is YNNPYNDGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18) or EISPGSGSTNYNEEFKG (SEQ ID NO:19) or YNNPYNAGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:101) or EINPGSGSTIYNEKFKG (SEQ ID NO:110), wherein N is any amino acid (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2 or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5, or humanized 2C8.vX, or humanized 3F12.v14, respectively); and
- (f) a CDR-H3 sequence comprising amino acids F1-F9, wherein F1-F9 is PTMLPWFAY (SEQ ID NO:20), or comprising amino acids F1-F5, wherein F1-F5 is

GYHGY (SEQ ID NO:21) or GYHGA (SEQ ID NO:22) (chimeric 2C8/humanized 2C8.v2/humanized 2C8.vX or chimeric 3F12/humanized 3F12.v5/ humanized 3F12.v14 or 3F12 clone 12, respectively).

In one preferred embodiment, SEQ ID NO:3 is KSSQSLLYSTAQKNFLA (SEQ ID NO:5) (3F12 clone 15). In a further preferred embodiment, SEQ ID NO:11 is QESYSTPWT (SEQ ID NO:10) (2C8 clone A8/humanized 2C8.vX) or QEVYSTPWT (SEQ ID NO:12) (2C8 clone H6).

In another preferred embodiment, the CDR-L1 sequence is SEQ ID NO:2 or 3 or 4 or 6.

In another preferred aspect, the antibody comprises either (i) all of the CDR-L1 to CDR-L3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15; or (ii) all of the CDR-H1 to CDR-H3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or all of SEQ ID NOS:16, 101, and 20, or all of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or all of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.

In another aspect, the antibody comprises either all of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or all of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or all of SEQ ID NOS:16, 101, and 20. In an alternative embodiment, the antibody comprises either all of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or all of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22. In an alternative embodiment, the antibody comprises either all of SEQ ID NOS:4, 8, and 14, or all of SEQ ID NOS:17, 110, and 21. In other embodiments, the antibody comprises (i) all of the CDR-L1 to CDR-L3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 or 2, 7 and 9, or of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15; and (ii) all of the CDR-H1 to CDR-H3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or of SEQ ID NOS:16, 101, and 20, or of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.

One preferred aspect is an anti- LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:23 or 24, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:25 or 26, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:23 and 25 or both SEQ ID NOS:24 and 26. Further preferred is an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:27 or 28, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:29, 30, or 31, or having light-chain and

heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:27 and 29, or both SEQ ID NOS:27 and 30, or both SEQ ID NOS:27 and 31, or both SEQ ID NOS:28 and 30, or both SEQ ID NOS:28 and 31. In a still further aspect, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:102, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:103, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:102 and 103. In a still further aspect, the invention provides an anti-LT α antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:108, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:109, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:108 and 109.

Antibodies in other embodiments comprise a human κ subgroup 1 consensus framework sequence, and/or they comprise a heavy-chain human subgroup III consensus framework sequence, wherein the framework sequence preferably comprises a substitution at position 71, 73, and/or 78. Such substitutions are preferably R71A, N73T, or N78A, or any combination thereof, most preferably all three.

The antibodies of this invention preferably bind to LT α 3 and block the interaction of LT α 3 with TNFRI and TNFRII. Preferably, they also bind to LT α β complex and especially on the cell surface. Preferably, they also block LT α β function, and/or preferably contain an Fc region, and/or decrease levels of inflammatory cytokines associated with RA in an *in vitro* collagen-induced arthritis assay or an *in vitro* antibody-induced arthritis assay.

Further preferred antibodies block the interaction of LT α β with LT β -R and/or modulate LT α β -expressing cells. In other preferred embodiments, the anti-LT α antibody herein substantially neutralizes at least one activity of at least one LT α protein. Preferably, the antibody herein targets any cell expressing LT α , and preferably depletes LT α -positive or -secreting cells.

Preferred antibodies herein bind LT α with an affinity of at least about 10^{-12} M, more preferably at least about 10^{-13} M. The antibodies also preferably are of the IgG isotype, such as IgG1, IgG2a, IgG2b, or IgG3, more preferably human IgG, and most preferably IgG1 or IgG2a.

Another preferred antibody has a monovalent affinity to human LT α that is about the same as or greater than the monovalent affinity to human LT α of a murine antibody produced by a hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number PTA-7538 (hybridoma murine Lymphotoxin alpha2 beta1 s5H3.2.2).

As is well established in the art, binding affinity of a ligand to its receptor can be determined using any of a variety of assays, and expressed in terms of a variety of quantitative values. Accordingly, in one embodiment, the binding affinity is expressed as K_d values and reflects intrinsic binding affinity (*e.g.*, with minimized avidity effects). Generally and preferably, binding affinity is measured *in vitro*, whether in a cell-free or cell-associated setting. Fold difference in binding affinity can be quantified in terms of the ratio of the monovalent binding affinity value of a humanized antibody (*e.g.*, in Fab form) and the monovalent binding affinity value of a reference/comparator antibody (*e.g.*, in Fab form) (*e.g.*, a murine antibody having donor CDR sequences), wherein the binding affinity values are determined under similar assay conditions.

Thus, in one embodiment, the fold difference in binding affinity is determined as the ratio of the K_d values of the humanized antibody in Fab form and said reference/comparator Fab antibody. For example, in one embodiment, if an antibody of the invention (A) has an affinity that is "three-fold lower" than the affinity of a reference antibody (M), then if the K_d value for A is 3x, the K_d value of M would be 1x, and the ratio of K_d of A to K_d of M would be 3:1. Conversely, in one embodiment, if an antibody of the invention (C) has an affinity that is "three-fold greater" than the affinity of a reference antibody (R), then if the K_d value for C is 1x, the K_d value of R would be 3x, and the ratio of K_d of C to K_d of R would be 1:3. Any assays known in the art, including those described herein, can be used to obtain binding affinity measurements, including, for example, an optical biosensor that uses SPR (BIAcore® technology), RIA, and ELISA. Preferably, the measurement is by optical biosensor or radioimmunoassay.

The antibodies herein are preferably chimeric or humanized, more preferably humanized, and still more preferably antibodies wherein at least a portion of their framework sequence is a human consensus framework sequence.

Another embodiment herein is an anti-idiotypic antibody that specifically binds the antibody herein.

Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (US 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as described above to elicit lymphocytes that produce or are capable

of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. After immunization, lymphocytes are isolated and then fused with a myeloma cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium which medium preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells (also referred to as fusion partner). For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the selective culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred fusion partner myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a selective medium that selects against the unfused parental cells. Preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 and derivatives, *e.g.*, X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as RIA or ELISA.

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis described in Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Once hybridoma cells that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for

example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal, *e.g.*, by i.p. injection of the cells into mice.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional antibody purification procedures such as, for example, affinity chromatography (*e.g.*, using protein A or protein G-SEPHAROSE™ medium) or ion-exchange chromatography, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, *etc.*

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

In a further embodiment, monoclonal antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high-affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA that encodes the antibody may be modified to produce chimeric or fusion antibody polypeptides, for example, by substituting human heavy-chain and light-chain constant-domain (C_H and C_L) sequences for the homologous murine sequences (US 4,816,567 and Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by fusing the immunoglobulin coding sequence with all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide (heterologous polypeptide). The non-immunoglobulin

polypeptide sequences can substitute for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

5 *Humanized antibodies*

The present invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized antibody can have one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al. Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al. Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al. Science* 239:1534-1536 (1988)), by substituting CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (US 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence that is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework for the humanized antibody (Sims *et al., J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al., J. Mol. Biol.* 196:901 (1987). Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to one method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly

available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available that illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

The humanized antibody may be an antibody fragment, such as a Fab, which is optionally conjugated with one or more cytotoxic agent(s) in order to generate an immunoconjugate. Alternatively, the humanized antibody may be a full-length antibody, such as a full-length IgG1 antibody.

Human antibodies and phage display methodology

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce 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. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array into 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 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); US 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (all of GenPharm); and 5,545,807; and WO 1997/17852.

Alternatively, phage-display technology (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody

exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the LT α cell. Phage display can be performed in a variety of formats, reviewed in, *e.g.*, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)
5 isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) or Griffith *et al.*, *EMBO J.*
10 12:725-734 (1993). See, also, US 5,565,332 and 5,573,905.

As discussed above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see US 5,567,610 and 5,229,275).

Antibody fragments

In certain circumstances there are advantages of using antibody fragments, rather than
15 whole antibodies. The smaller size of the fragments allows for rapid clearance, and may lead to improved access to solid tumors.

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)
20 and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. Fab, Fv and ScFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli*, thus allowing the facile production of large amounts of these fragments. Antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and
25 chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and F(ab')₂ fragment with increased *in vivo* half-life comprising a salvage receptor binding epitope residues are described in U.S. Patent No. 5,869,046. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the
30 skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See, *e.g.*, WO 1993/16185; U.S. 5,571,894; and U.S. 5,587,458. Fv and sFv are the only species with intact combining sites that are devoid of constant regions; thus, they are suitable for reduced nonspecific binding during *in vivo* use. sFv fusion proteins may

be constructed to yield fusion of an effector protein at either the amino or the carboxy terminus of an sFv. The antibody fragment may also be a "linear antibody", *e.g.*, as described in U.S. 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

5 *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the LT α protein. Other such antibodies may combine a LT α binding site with a binding site for another protein. Alternatively, an anti-LT α arm may be combined with an arm that binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.* CD3), or Fc receptors for IgG (Fc γ R), such as Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16), or NKG2D or other NK-cell-activating ligand, so as to focus and localize cellular defense mechanisms to the LT α -expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells that express LT α . These antibodies possess a LT α -binding arm and
10 an arm that binds the cytotoxic agent (*e.g.*, saporin, anti-interferon- α , vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full-length antibodies or antibody fragments (*e.g.*, F(ab')₂ bispecific antibodies).

WO 1996/16673 describes a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII antibody and US 5,837,234 discloses a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc γ RI antibody. A bispecific anti-
20 ErbB2/Fc α antibody is shown in WO 1998/02463. US 5,821,337 teaches a bispecific anti-ErbB2/anti-CD3 antibody.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full-length bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two chains have different
25 specificities (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar
30 procedures are disclosed in WO 1993/08829, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant-

domain sequences. Preferably, the fusion is with an Ig heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, C_H2, and C_H3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (C_H1) containing the site necessary for light-chain bonding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host cell. This provides for greater flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yield of the desired bispecific antibody. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains into a single expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios have no significant effect on the yield of the desired chain combination.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy-chain/light-chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 1994/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

In another approach (US 5,731,168), the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers that are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.*, tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.*, alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to

unwanted cells (US 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 1991/00360, WO 1992/20373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed, for example, in US 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

5 Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describes a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent, sodium arsenite, to stabilize
10 vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of
15 enzymes.

 Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describes the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to
20 directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

 Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly
25 from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody
30 heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a V_H connected to a V_L by a linker that is too short to

allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been
 5 reported. See Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Multivalent Antibodies

A multivalent antibody may be internalized (and/or catabolized) faster than a bivalent
 10 antibody by a cell expressing an antigen to which the antibodies bind. The antibodies of the present invention can be multivalent antibodies (which are other than of the IgM class) with three or more antigen-binding sites (*e.g.*, tetravalent antibodies), which can be readily produced by recombinant expression of nucleic acid encoding the polypeptide chains of the antibody. The multivalent antibody can comprise a dimerization domain and three or more
 15 antigen-binding sites. The preferred dimerization domain comprises (or consists of) an Fc region or a hinge region. In this scenario, the antibody will comprise an Fc region and three or more antigen binding sites amino-terminal to the Fc region. The preferred multivalent antibody herein comprises (or consists of) three to about eight, but preferably four, antigen-binding sites. The multivalent antibody comprises at least one polypeptide chain (and
 20 preferably two polypeptide chains), wherein the polypeptide chain(s) comprise two or more variable domains. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, wherein $VD1$ is a first variable domain, $VD2$ is a second variable domain, Fc is one polypeptide chain of an Fc region, $X1$ and $X2$ represent an amino acid or polypeptide, and n is 0 or 1. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise: $VH-CH1-flexible\ linker-VH-$
 25 $CH1-Fc$ region chain; or $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ region chain. The multivalent antibody herein preferably further comprises at least two (and preferably four) light chain variable-domain polypeptides. The multivalent antibody herein may, for instance, comprise from about two to about eight light-chain variable-domain polypeptides. The light-chain variable-domain polypeptides contemplated herein comprise a light-chain variable-domain and,
 30 optionally, further comprise a CL domain.

Vectors, Host Cells, and Recombinant Methods

Selection and transformation of host cells

Suitable host cells for cloning or expressing the recombinant monoclonal antibodies,

immunoadhesins, and other polypeptide antagonists described herein are prokaryote, yeast, or higher eukaryotic cells. Suitable prokaryotes for this purpose include eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g.,
 5 *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. One preferred *E. coli* cloning host is *E. coli* 294 (ATCC 31,446), although other strains such as *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), and *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) are suitable.

10 These examples are illustrative rather than limiting.

Full-length antibody, antibody fragments, and antibody fusion proteins can be produced in bacteria, in particular when glycosylation and Fc effector functions are not needed, such as when the therapeutic antibody is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a toxin) and the immunoconjugate by itself shows effectiveness in tumor cell destruction. Full-
 15 length antibodies have greater half life in circulation. Production in *E. coli* is faster and more cost efficient. For expression of antibody fragments and polypeptides in bacteria, see, e.g., US 5,648,237; 5,789,199; and 5,840,523, which describe translation- initiation region (TIR) and signal sequences for optimizing expression and secretion. After expression, the antibody is isolated from the *E. coli* cell paste in a soluble fraction and can be purified through, e.g., a
 20 protein A or G column depending on the isotype. Final purification can be carried out similar to the process for purifying antibody expressed e.g., in CHO cells. For general monoclonal antibody production, see also US 7,011,974.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for antibody-encoding, such as LT α -antibody-encoding,
 25 vectors. *Saccharomyces cerevisiae*, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other genera, species, and strains are commonly available and useful herein, such as *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hosts such as, e.g., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum*
 30 (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis*; and filamentous fungi such as, e.g.,

Neurospora, *Penicillium*, *Tolytocladium*, and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* and *A. niger*.

Suitable host cells for the expression of, e.g., glycosylated LT α -binding antibody are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include plant and insect
 5 cells. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* have been identified. A variety of viral strains for transfection are publicly available, e.g., the L-1 variant of *Autographa californica* NPV and the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV, and such
 10 viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

Plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco can also be utilized as hosts.

However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate
 15 cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (e.g., 293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, e.g., ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub
 20 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), including, but not limited to CHO K1, CHO pro3⁻, CHO DG44, CHO DUXB11, Lec13, B-Ly1, and CHO DP12 cells, preferably a CHO DUX (DHFR-) or subclone thereof (herein called "CHO DUX"); C127 cells, mouse L cells; Ltk⁻ cells; mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76,
 25 ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HeLa, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse myeloma cells; NS0; hybridoma cells such as mouse hybridoma cells; COS cells; mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*
 30 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed with expression or cloning vectors for production of the LT α -binding antibody herein, and cultured in conventional nutrient media modified as

appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Culturing the host cells

The host cells used to produce an antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), US 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 1990/03430; WO 1987/00195; or US Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCINTM drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

In one particular aspect, a suitable medium contains a basal medium component such as a DMEM/HAM F-12 based formulation (for composition of DMEM and HAM F12 media and especially serum-free media, see culture media formulations in the *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, Sixth Edition, 1988, pages 346-349) (the formulations of medium as described in US 5,122,469 may be appropriate) with suitably modified, if necessary, concentrations of some components such as amino acids, salts, sugar, and vitamins, and optionally containing glycine, hypoxanthine, and thymidine; recombinant human insulin, hydrolyzed peptone, such as PROTEASE PEPTONE 2 and 3TM, PRIMATONE HSTM or PRIMATONE RLTM (Difco, USA; Sheffield, England), or the equivalent; a cell-protective agent, such as PLURONIC F68TM or the equivalent PLURONICTM polyol; GENTAMYCINTM antibiotic; and trace elements. Preferably the cell culture media is serum free.

In one aspect of the invention, antibody production is conducted in large quantity by a fermentation process. Various large-scale fed-batch fermentation procedures are available for

production of recombinant proteins. Large-scale fermentations have at least about 1000 liters of capacity, preferably about 1,000 to 100,000 liters of capacity. These fermentors use agitator impellers to distribute oxygen and nutrients, especially glucose (the preferred carbon/energy source). Small-scale fermentation refers generally to fermentation in a fermentor that is no more than approximately 100 liters in volumetric capacity, and can range from about one liter to about 100 liters.

In a fermentation process, induction of protein expression is typically initiated after the cells have been grown under suitable conditions to a desired density, *e.g.*, an OD₅₅₀ of about 180-220, at which stage the cells are in the early stationary phase. A variety of inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art and described above. Cells may be grown for shorter periods prior to induction. Cells are usually induced for about 12-50 hours, although longer or shorter induction time may be used.

To improve the production yield and quality of the polypeptides of the invention, various fermentation conditions can be modified. For example, to improve the proper assembly and folding of the secreted antibody polypeptides, additional vectors overexpressing chaperone proteins, such as Dsb proteins (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD and or DsbG) or FkpA (a peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase with chaperone activity) can be used to co-transform the host prokaryotic cells. The chaperone proteins have been demonstrated to facilitate the proper folding and solubility of heterologous proteins produced in bacterial host cells. Chen *et al.*, *J Bio Chem* 274:19601-19605 (1999); US 6,083,715 and 6,027,888; Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000); and Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001).

To minimize proteolysis of expressed heterologous proteins (especially those that are proteolytically sensitive), certain host strains deficient for proteolytic enzymes can be used for the present invention. For example, host cell strains may be modified to effect genetic mutation(s) in the genes encoding known bacterial proteases such as Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI and combinations thereof. Some *E. coli* protease-deficient strains are available and described in, for example, US 5,264,365; 5,508,192; and Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

In one embodiment, *E. coli* strains deficient for proteolytic enzymes and transformed with plasmids overexpressing one or more chaperone proteins are used as host cells in the expression system herein.

Purification of antibody

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Where the antibody is secreted into the medium,

5 supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an AMICONTM or MILLIPORE PELLICONTM ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis, and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious

10 contaminants.

In one embodiment, the antibody protein produced herein is further purified to obtain preparations that are substantially homogeneous for further assays and uses. Standard protein purification methods known in the art can be employed. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: hydroxylapatite chromatography,

15 chromatography on heparin SEPHAROSETM, gel electrophoresis, dialysis, fractionation on immunoaffinity columns, ethanol precipitation, reverse-phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on an anion- or cation-exchange resin (such as DEAE or a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration using, for example, SEPHADEXTM G-75 resin. Affinity chromatography is

20 a preferred purification technique. For analytical-scale purification, smaller volumes are passed through columns and used; for preparative- or commercial-scale purification to produce quantities of antibody useful in therapeutic applications, larger volumes are employed. The skilled artisan will understand which scale should be used for which application. Preferably, preparative scale is employed for this invention.

25 The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human $\gamma 1$, $\gamma 2$, or $\gamma 4$ heavy chains (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human $\gamma 3$ (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand

30 is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled-pore glass or poly(styrene-divinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody

comprises a C_H3 domain, the BAKERBOND ABX™ resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification.

For Protein A chromatography, the solid phase to which Protein A is immobilized is preferably a column comprising a glass or silica surface, more preferably a controlled pore
5 glass column or a silicic acid column. In some applications, the column has been coated with a reagent, such as glycerol, to prevent nonspecific adherence of contaminants. The solid phase is then washed to remove contaminants non-specifically bound to the solid phase. Finally, the antibody of interest is recovered from the solid phase by elution.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody
10 of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic-interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0 to 0.25M salt).

Generating variant antibodies exhibiting reduced or absence of HAMA response

Reduction or elimination of a HAMA response is a significant aspect of clinical
15 development of suitable therapeutic agents. See, e.g., Khazzaeli *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:937 (1988); Jaffers *et al.*, *Transplantation*, 41:572 (1986); Shawler *et al.*, *J. Immunol.*, 135:1530 (1985); Sears *et al.*, *J. Biol. Response Mod.*, 3:138 (1984); Miller *et al.*, *Blood*, 62:988 (1983); Hakimi *et al.*, *J. Immunol.*, 147:1352 (1991); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323 (1988); and Junghans *et al.*, *Cancer Res*, 50:1495 (1990). In some embodiments
20 herein, the invention provides antibodies that are humanized such that HAMA response is reduced or eliminated. Variants of these antibodies can further be obtained using routine methods known in the art, some of which are further described below.

For example, an amino acid sequence from an antibody as described herein can serve as a starting (parent) sequence for diversification of the framework and/or CDR sequence(s).
25 A selected framework sequence to which a starting CDR sequence is linked is referred to herein as an acceptor human framework. While the acceptor human frameworks may be from, or derived from, a human immunoglobulin (the VL and/or VH regions thereof), preferably the acceptor human frameworks are from, or derived from, a human consensus framework sequence, as such frameworks have been demonstrated to have minimal, or no,
30 immunogenicity in human patients.

Where the acceptor is derived from a human immunoglobulin, one may optionally select a human framework sequence based on its homology to the donor framework sequence by aligning the donor framework sequence with various human framework sequences in a collection of human framework sequences and selecting the most homologous framework sequence as the acceptor.

In one embodiment, human consensus frameworks herein are from, or derived from, VH subgroup III and/or VL kappa subgroup I consensus framework sequences.

Thus, the VH acceptor human framework may comprise one, two, three, or all of the following framework sequences:

- FR1 comprising EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46),
- FR2 comprising WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:47),
- FR3 comprising FR3 comprises RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:48), or RATFSADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAD (SEQ ID NO:50), and
- FR4 comprising WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49).

The VL acceptor human framework may comprise one, two, three, or all of the following framework sequences:

- FR1 comprising DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:51),
- FR2 comprising WYQQKPGKAPKLQIY (SEQ ID NO:52), or WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:55),
- FR3 comprising GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53), and
- FR4 comprising FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 54).

While the acceptor may be identical in sequence to the human framework sequence selected, whether that be from a human immunoglobulin or a human consensus framework, the present invention contemplates that the acceptor sequence may comprise pre-existing amino acid substitutions relative to the human immunoglobulin sequence or human consensus framework sequence. These pre-existing substitutions are preferably minimal, usually only four, three, two, or one amino acid difference relative to the human immunoglobulin sequence or consensus framework sequence.

CDR residues of the non-human antibody are incorporated into the VL and/or VH acceptor human frameworks. For example, one may incorporate residues corresponding to the Kabat CDR residues, the Chothia hypervariable loop residues, the AbM residues, and/or the contact residues. Optionally, the extended CDR residues as follows are incorporated: 24-

34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102, or 95-102 (H3).

"Incorporation" of CDR residues can be achieved in various ways, *e.g.*, nucleic acid encoding the desired amino acid sequence can be generated by mutating nucleic acid encoding the mouse variable domain sequence so that the framework residues thereof are changed to acceptor human framework residues, or by mutating nucleic acid encoding the human variable domain sequence so that the CDR residues are changed to non-human residues, or by synthesizing nucleic acid encoding the desired sequence, *etc.*

CDR-grafted variants may be generated by Kunkel mutagenesis of nucleic acid encoding the human acceptor sequences, using a separate oligonucleotide for each CDR. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Appropriate changes can be introduced within the framework and/or CDR, using routine techniques, to correct and re-establish proper CDR-antigen interactions.

Phage(mid) display (also referred to herein as phage display in some contexts) can be used as a convenient and fast method for generating and screening many different potential variant antibodies in a library generated by sequence randomization. However, other methods for making and screening altered antibodies are available to the skilled person.

Phage(mid) display technology has provided a powerful tool for generating and selecting novel proteins that bind to a ligand, such as an antigen. Using the techniques of phage(mid) display allows the generation of large libraries of protein variants that can be rapidly sorted for those sequences that bind to a target molecule with high affinity. Nucleic acids encoding variant polypeptides are generally fused to a nucleic acid sequence encoding a viral coat protein, such as the gene III protein or the gene VIII protein. Monovalent phagemid display systems where the nucleic acid sequence encoding the protein or polypeptide is fused to a nucleic acid sequence encoding a portion of the gene III protein have been developed. (Bass, *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). In a monovalent phagemid display system, the gene fusion is expressed at low levels and wild-type gene III proteins are also expressed so that infectivity of the particles is retained. Methods of generating peptide libraries and screening those libraries have been disclosed in many patents (*e.g.*, US 5,723,286; 5,432,018; 5,580,717; 5,427,908; and 5,498,530).

Libraries of antibodies have been prepared in a number of ways including by altering a single gene by inserting random DNA sequences or cloning a family of related genes.

Methods for displaying antibodies or antigen-binding fragments using phage(mid) display are described in US 5,750,373; 5,733,743; 5,837,242; 5,969,108; 6,172,197; 5,580,717; and 5,658,727. The library is then screened for expression of antibodies or antigen-binding proteins with the desired characteristics.

5 The sequence of oligonucleotides includes one or more of the designed codon sets for the CDR residues to be altered. A codon set is a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids. Codon sets can be represented using symbols to designate particular nucleotides or equimolar mixtures of nucleotides as shown below according to the IUB code.

- 10 IUB CODES
- G Guanine
- A Adenine
- T Thymine
- C Cytosine
- 15 R (A or G)
- Y (C or T)
- M (A or C)
- K (G or T)
- S (C or G)
- 20 W (A or T)
- H (A or C or T)
- B (C or G or T)
- V (A or C or G)
- D (A or G or T) H
- 25 N (A or C or G or T)

For example, in the codon set DVK, D can be nucleotides A or G or T; V can be A or G or C; and K can be G or T. This codon set can present 18 different codons and can encode amino acids Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, and Cys.

30 Oligonucleotide or primer sets can be synthesized using standard methods. A set of oligonucleotides can be synthesized, for example, by solid-phase synthesis, containing sequences that represent all possible combinations of nucleotide triplets provided by the codon set and that will encode the desired group of amino acids. Synthesis of oligonucleotides with selected nucleotide "degeneracy" at certain positions is well known in

that art. Such sets of nucleotides having certain codon sets can be synthesized using commercial nucleic acid synthesizers (available from, for example, Applied Biosystems, Foster City, CA), or can be obtained commercially (for example, from Life Technologies, Rockville, MD). Therefore, a set of oligonucleotides synthesized having a particular codon set will typically include a plurality of oligonucleotides with different sequences, the differences established by the codon set within the overall sequence. Oligonucleotides, as used herein, have sequences that allow for hybridization to a variable-domain nucleic acid template and also can include restriction enzyme sites for cloning purposes.

In one method, nucleic acid sequences encoding variant amino acids can be created by oligonucleotide-mediated mutagenesis. This technique is well known in the art as described by Zoller *et al.* *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Briefly, nucleic acid sequences encoding variant amino acids are created by hybridizing an oligonucleotide set encoding the desired codon sets to a DNA template, where the template is the single-stranded form of the plasmid containing a variable-region nucleic acid template sequence. After hybridization, DNA polymerase is used to synthesize an entire second complementary strand of the template that will thus incorporate the oligonucleotide primer, and will contain the codon sets as provided by the oligonucleotide set.

Generally, oligonucleotides of at least 25 nucleotides in length are used. An optimal oligonucleotide will have 12 to 15 nucleotides that are completely complementary to the template on either side of the nucleotide(s) coding for the mutation(s). This ensures that the oligonucleotide will hybridize properly to the single-stranded DNA template molecule. The oligonucleotides are readily synthesized using techniques known in the art such as that in Crea *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

The DNA template is generated by those vectors that are derived from bacteriophage M13 vectors (the commercially available M13mp18 and M13mp19 vectors are suitable), or that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA to be mutated can be inserted into one of these vectors to generate single-stranded template. Production of the single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al.*, *supra*.

To alter the native DNA sequence, the oligonucleotide is hybridized to the single stranded template under suitable hybridization conditions. A DNA-polymerizing enzyme, for example, T7 DNA polymerase or the Klenow fragment of DNA polymerase I, is then added to synthesize the complementary strand of the template using the oligonucleotide as a primer

for synthesis. A heteroduplex molecule is thus formed such that one strand of DNA encodes the mutated form of gene 1, and the other strand (the original template) encodes the native, unaltered sequence of gene 1. This heteroduplex molecule is then transformed into a suitable host cell, usually a prokaryote such as *E. coli* JM101. After growing the cells, they are plated
5 onto agarose plates and screened using the oligonucleotide primer radiolabeled with a ³²P phosphate to identify the bacterial colonies that contain the mutated DNA.

The method described immediately above may be modified such that a homoduplex molecule is created wherein both strands of the plasmid contain the mutation(s). The modifications are as follows: The single-stranded oligonucleotide is annealed to the single-
10 stranded template as described above. A mixture of three deoxyribonucleotides, deoxyriboadenosine (dATP), deoxyriboguanosine (dGTP), and deoxyribothymidine (dTTP), is combined with a modified thiodeoxyribocytosine called dCTP-(aS) (which can be obtained from Amersham). This mixture is added to the template-oligonucleotide complex. Upon addition of DNA polymerase to this mixture, a strand of DNA identical to the template except
15 for the mutated bases is generated. In addition, this new strand of DNA will contain dCTP-(aS) instead of dCTP, which serves to protect it from restriction endonuclease digestion. After the template strand of the double-stranded heteroduplex is nicked with an appropriate restriction enzyme, the template strand can be digested with ExoIII nuclease or another appropriate nuclease past the region that contains the site(s) to be mutagenized. The reaction
20 is then stopped to leave a molecule that is only partially single-stranded. A complete double-stranded DNA homoduplex is then formed using DNA polymerase in the presence of all four deoxyribonucleotide triphosphates, ATP, and DNA ligase. This homoduplex molecule can then be transformed into a suitable host cell.

As indicated previously, the sequence of the oligonucleotide set is of sufficient length
25 to hybridize to the template nucleic acid and may also, but does not necessarily, contain restriction sites. The DNA template can be generated by those vectors that are either derived from bacteriophage M13 vectors or vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera *et al. Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA that is to be mutated must be inserted into one of these vectors in order to generate single-stranded
30 template. Production of the single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al., supra*.

In another method, a library can be generated by providing upstream and downstream oligonucleotide sets, each set having a plurality of oligonucleotides with different sequences.

These sequences are established by the codon sets provided within the sequence of the oligonucleotides. The upstream and downstream oligonucleotide sets, along with a variable-domain template nucleic acid sequence, can be used in a polymerase chain reaction (PCR) to generate a "library" of PCR products. The PCR products can be referred to as "nucleic acid cassettes", as they can be fused with other related or unrelated nucleic acid sequences, for example, viral coat proteins and dimerization domains, using established molecular biology techniques.

The sequence of the PCR primers includes one or more of the designed codon sets for the solvent-accessible and highly diverse positions in a CDR. As described above, a codon set is a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids.

Antibody selectants that meet the desired criteria, as selected through appropriate screening/selection steps, can be isolated and cloned using standard recombinant techniques.

Activity Assays

The antibodies of the present invention can be characterized for their physical/chemical properties and biological functions by various assays known in the art.

The purified immunoglobulins can be further characterized by a series of assays including, but not limited to, N-terminal sequencing, amino-acid analysis, non-denaturing size-exclusion high-pressure liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, ion-exchange chromatography, and papain digestion.

In certain embodiments of the invention, the antibodies produced herein are analyzed for their biological activity. In some embodiments, the antibodies herein are tested for their antigen-binding activity. The antigen-binding assays known in the art and useful herein include, without limitation, any direct or competitive-binding assays using techniques such as Western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, fluorescent immunoassays, and protein A immunoassays.

In one embodiment, the present invention contemplates an altered antibody that possesses some but not all effector functions, which make it a desired candidate for many applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important, yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. In certain embodiments, the Fc activities of the produced immunoglobulin are measured to ensure that only the desired properties are maintained. *In vitro* and/or *in vivo* cytotoxicity assays can be

conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks Fc γ R binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc γ RIII only, whereas monocytes express Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). An example of an *in vitro* assay to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in US 5,500,362 or 5,821,337. Useful effector cells for such assays include PBMCs and NK cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in an animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. To assess complement activation, a CDC assay, e.g., as described in Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed. FcRn binding and *in vivo* clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art.

Antibody Variants

In some embodiments, amino-acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid alterations may be introduced into the subject antibody amino acid sequence at the time that the sequence is made.

A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine-scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by

introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed immunoglobulins are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (*e.g.*, for ADEPT) or a polypeptide that increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the CDRs, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table A under the heading of "preferred substitutions." If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table A, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

TABLE A

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (as described, for example, in A. L. Lehninger, *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acidic: Asp (D), Glu (E)

(4) basic: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

One type of substitutional variant involves substituting one or more CDR residues of a parent antibody (*e.g.*, a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several CDR sites (*e.g.*, 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibodies thus generated are displayed from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.*, binding affinity) as herein disclosed. For location of candidate CDR sites for modification, alanine-scanning mutagenesis can be performed to identify CDR residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antibody.

The antibodies of the present invention preferably have the native-sequence Fc region. However, it may be desirable to introduce one or more amino acid modifications into an Fc region thereof, generating a Fc-region variant. The Fc-region variant may comprise a human Fc region sequence (*e.g.*, a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (*e.g.*, a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge cysteine. These antibodies would nonetheless retain substantially the same characteristics required for therapeutic utility as compared to their wild-type counterpart.

Such amino acid substitutions may, *e.g.*, improve or reduce other Fc function or further improve the same Fc function, increase antigen-binding affinity, increase stability, alter glycosylation, or include allotypic variants. The antibodies may further comprise one or more amino acid substitutions in the Fc region that result in the antibody exhibiting one or more of the properties selected from increased FcγR binding, increased ADCC, increased CDC, decreased CDC, increased ADCC and CDC function, increased ADCC but decreased CDC function (*e.g.*, to minimize infusion reaction), increased FcRn binding, and increased serum half life, as compared to the same antibodies that have the wild-type Fc region. These activities can be measured by the methods described herein. For example, see WO 1999/51642. See also Duncan and Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); US 5,648,260; US 5,624,821; and WO 1994/29351 concerning other examples of Fc region variants.

For additional amino acid alterations that improve Fc function, see, *e.g.*, US 6,737,056. Any of the antibodies of the present invention may further comprise at least one amino acid substitution in the Fc region that decreases CDC activity, for example, comprising at least the substitution K322A. See US 6,528,624 (Idusogie *et al.*).

In another preferred embodiment, the antibody has amino acid substitutions at any one or any combination of positions that are 268D, or 298A, or 326D, or 333A, or 334A, or 298A together with 333A, or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E and 272Y and 254T and 256E, or 250Q together with 428L, or 265A, or 297A, wherein the 265A substitution is in the absence of 297A and the 297A substitution is in the absence of 265A. The letter after the number in each of these designations represents the changed amino acid at that position.

Mutations that improve ADCC and CDC include substitutions at one to three positions of the Fc region, including positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (Eu numbering of residues), especially S298A together with E333A and K334A (S298A/E333A/K334A, or synonymously a combination of 298A, 333A, and 334A), also referred to herein as the triple Ala mutant. K334L increases binding to CD16. K322A results in reduced CDC activity; K326A or K326W enhances CDC activity. D265A results in reduced ADCC activity.

Stability variants are variants that show improved stability with respect to, *e.g.*, oxidation and deamidation.

A further type of amino acid variant of the antibody alters the original glycosylation pattern of the antibody. Such altering includes deleting one or more carbohydrate moieties
5 found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody. Glycosylation variants that increase ADCC function are described, *e.g.*, in WO 2003/035835. See also US 2006/0067930.

Glycosylation of polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue.
10 The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose,
15 or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by
20 the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

Where the antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. For example, antibodies with a mature carbohydrate structure that lacks fucose attached to an Fc region of the antibody are described in US 2003/0157108 (Presta). See also
25 US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antibodies with a bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the carbohydrate attached to an Fc region of the antibody are referenced in, *e.g.*, WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* and US 6,602,684 (Umana *et al.*). Antibodies with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to an Fc region of the antibody are reported, for example, in WO 1997/30087 (Patel *et al.*). See, also, WO
30 1998/58964 (Raju) and WO 1999/22764 (Raju) concerning antibodies with altered carbohydrate attached to the Fc region thereof. See also US 2005/0123546 (Umana *et al.*); US 2004/0072290 (Umana *et al.*); US 2003/0175884 (Umana *et al.*); WO 2005/044859 (Umana *et al.*); and US 2007/0111281 (Sondermann *et al.*) on antigen-binding molecules

with modified glycosylation, including antibodies with an Fc region containing N-linked oligosaccharides; and US 2007/0010009 (Kanda *et al.*)

One preferred glycosylation antibody variant herein comprises an Fc region wherein a carbohydrate structure attached to the Fc region has reduced fucose or lacks fucose, which
5 may improve ADCC function. Specifically, antibodies are contemplated herein that have reduced fucose relative to the amount of fucose on the same antibody produced in a wild-type CHO cell. That is, they are characterized by having a lower amount of fucose than they would otherwise have if produced by native CHO cells. Preferably the antibody is one wherein less than about 10% of the N-linked glycans thereon comprise fucose, more
10 preferably wherein less than about 5% of the N-linked glycans thereon comprise fucose, and most preferably, wherein none of the N-linked glycans thereon comprise fucose, *i.e.*, wherein the antibody is completely without fucose, or has no fucose.

Such "defucosylated" or "fucose-deficient" antibodies may be produced, for example, by culturing the antibodies in a cell line such as that disclosed in, for example, US
15 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; US 2006/0063254; US 2006/0064781; US 2006/0078990; US 2006/0078991; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); and Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Examples of cell lines producing defucosylated
20 antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 A1 (Presta) and WO 2004/056312 A1 (Adams *et al.*, especially at Example 11) and knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8*- knockout CHO cells (Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)). See also Kanda *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94: 680-8 (2006). US
25 2007/0048300 (Biogen-IDEC) discloses a method of producing aglycosylated Fc-containing polypeptides, such as antibodies, having desired effector function, as well as aglycosylated antibodies produced according to the method and methods of using such antibodies as therapeutics, all being applicable herein. Additionally, US 7,262,039 relates to a polypeptide
30 having an alpha-1,3-fucosyltransferase activity, including a method for producing a fucose-containing sugar chain using the polypeptide.

See also US 2006/024304 (Gerngross *et al.*); US Patent No. 7,029,872 (Gerngross); US 2004/018590 (Gerngross *et al.*); US 2006/034828 (Gerngross *et al.*); US 2006/034830

(Gerngross *et al.*); US 2006/029604 (Gerngross *et al.*); WO 2006/014679 (Gerngross *et al.*); WO 2006/014683 (Gerngross *et al.*); WO 2006/014685 (Gerngross *et al.*); WO 2006/014725 (Gerngross *et al.*); and WO 2006/014726 (Gerngross *et al.*) on recombinant glycoproteins and glycosylation variants that are applicable herein.

5 In another embodiment, the invention provides an antibody composition comprising the antibodies described herein having an Fc region, wherein about 20-100% of the antibodies in the composition comprise a mature core carbohydrate structure in the Fc region that lacks a fucose. Preferably, such composition comprises antibodies having an Fc region that has been altered to change one or more of the antibody-dependent cell-mediated
10 cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), or pharmacokinetic properties of the antibody compared to a wild-type IgG Fc sequence by substituting an amino acid selected from the group consisting of A, D, E, L, Q, T, and Y at any one or any combination of positions of the Fc region selected from the group consisting of: 238, 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280,
15 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438, and 439.

The composition is more preferably one wherein the antibody further comprises an Fc substitution that is 268D or 326D or 333A together with 334A, or 298A together with 333A,
20 or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E, wherein the
25 letter after the number in each of these designations represents the changed amino acid at that position.

The composition is additionally preferably one wherein the antibody binds an Fc γ RIII. The composition further is preferably such that the antibody has ADCC activity in the presence of human effector cells or has increased ADCC activity in the presence of
30 human effector cells compared to the otherwise same antibody comprising a human wild-type IgG1Fc region.

The composition is also preferably one wherein the antibody binds the Fc γ RIII with better affinity, or mediates ADCC more effectively, than a glycoprotein with a mature core

carbohydrate structure including fucose attached to the Fc region of the glycoprotein. In addition, the composition is preferably one wherein the antibody has been produced by a CHO cell, preferably a Lec13 cell. The composition is also preferably one wherein the antibody has been produced by a mammalian cell lacking a fucosyltransferase gene, more preferably the *FUT8* gene.

In one aspect, the composition is one wherein the antibody is free of bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) attached to the mature core carbohydrate structure. Alternatively, the composition is such that the antibody has bisecting GlcNAc attached to the mature core carbohydrate structure.

In another aspect, the composition is one wherein the antibody has one or more galactose residues attached to the mature core carbohydrate structure. Alternatively, the composition is such that the antibody is free of one or more galactose residues attached to the mature core carbohydrate structure.

In a further aspect, the composition is one wherein the antibody has one or more sialic acid residues attached to the mature core carbohydrate structure. Alternatively, the composition is such that the antibody is free of one or more sialic acid residues attached to the mature core carbohydrate structure.

This composition preferably comprises at least about 2% afucosylated antibodies. The composition more preferably comprises at least about 4% afucosylated antibodies. The composition still more preferably comprises at least about 10% afucosylated antibodies. The composition even more preferably comprises at least about 19% afucosylated antibodies. The composition most preferably comprises about 100% afucosylated antibodies.

Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates, or antibody-drug conjugates (ADC), comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a drug, a growth-inhibitory agent, a toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

The use of antibody-drug conjugates for the local delivery of cytotoxic or cytostatic agents, *e.g.*, drugs to kill or inhibit tumor cells in the treatment of cancer (Syrigos and Epenetos, *Anticancer Research* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172 (1997); and US 4,975,278) allows targeted delivery of the drug moiety to tumors, and intracellular accumulation therein, where systemic administration of

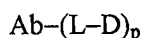
these unconjugated drug agents may result in unacceptable levels of toxicity to normal cells as well as the tumor cells sought to be eliminated (Baldwin *et al.*, *Lancet*, 603-05 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (eds), pp. 475-506 (1985)). Maximal efficacy with minimal toxicity is sought thereby. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been reported as useful in these strategies (Rowland *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87 (1986)). Drugs used in these methods include daunomycin, doxorubicin, methotrexate, and vindesine. Toxins used in antibody-toxin conjugates include bacterial toxins such as diphtheria toxin, plant toxins such as ricin, small-molecule toxins such as geldanamycin (Mandler *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 92(19):1573-1581 (2000); Mandler *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, 10:1025-1028 (2000); and Mandler *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 13: 786-791 (2002)), maytansinoids (EP 1391213 and Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8618-8623 (1996)), and calicheamicin (Lode *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2928 (1998); and Hinman *et al.*, *Cancer Res.*, 53:3336-3342 (1993)). Without being limited to any one theory, the toxins may exert their cytotoxic and cytostatic effects by mechanisms including tubulin binding, DNA binding, or topoisomerase inhibition. Some cytotoxic drugs tend to be inactive or less active when conjugated to large antibodies or protein receptor ligands.

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re . Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and

bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See, for example, WO 1994/11026.

Conjugates of an antibody and one or more small-molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoid, trichothecene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

In the ADCs of the invention, an antibody (Ab) is conjugated to one or more drug moieties (D), *e.g.*, about 1 to about 20 drug moieties per antibody, through a linker (L). The ADC of Formula I may be prepared by several routes, employing organic chemistry reactions, conditions, and reagents known to those skilled in the art, including: (1) reaction of a nucleophilic group of an antibody with a bivalent linker reagent, to form Ab-L, via a covalent bond, followed by reaction with a drug moiety D; and (2) reaction of a nucleophilic group of a drug moiety with a bivalent linker reagent, to form D-L, via a covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody.



Formula I

Nucleophilic groups on antibodies include, but are not limited to: (i) N-terminal amine groups, (ii) side-chain amine groups, *e.g.*, lysine, (iii) side-chain thiol groups, *e.g.*, cysteine, and (iv) sugar hydroxyl or amino groups where the antibody is glycosylated. Amine, thiol, and hydroxyl groups are nucleophilic and capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; and (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups. Certain antibodies have reducible interchain disulfides, *i.e.*, cysteine bridges. Antibodies may be made reactive for conjugation with linker reagents by treatment with a reducing agent such as DTT (dithiothreitol). Each cysteine bridge will thus form, theoretically, two reactive thiol nucleophiles. Additional nucleophilic groups can be introduced into antibodies through the reaction of lysines with 2-iminothiolane (Traut's reagent) resulting in conversion of an amine into a thiol.

Antibody-drug conjugates of the invention may also be produced by modification of the antibody to introduce electrophilic moieties, which can react with nucleophilic substituents on the linker reagent or drug. The sugars of glycosylated antibodies may be

oxidized, *e.g.*, with periodate oxidizing reagents, to form aldehyde or ketone groups that may react with the amine group of linker reagents or drug moieties. The resulting imine Schiff base groups may form a stable linkage, or may be reduced, *e.g.*, by borohydride reagents to form stable amine linkages. In one embodiment, reaction of the carbohydrate portion of a glycosylated antibody with either galactose oxidase or sodium meta-periodate may yield carbonyl (aldehyde and ketone) groups in the protein that can react with appropriate groups on the drug (Domen *et al.*, *J. Chromatog.*, 510: 293-302 (1990)). In another embodiment, proteins containing N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino acid (Geoghegan and Stroh, *Bioconjugate Chem.*, 3:138-146 (1992) and US 5,362,852). Such aldehyde can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to: amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine carboxylate, and arylhydrazide groups capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; and (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be made, *e.g.*, by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide that does not destroy the desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (*e.g.*, avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (*e.g.*, a radionucleotide).

The ADCs herein are optionally prepared with cross-linker reagents, such as, for example, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate), which are commercially available (*e.g.*, from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.). See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Antibody Derivatives

The antibodies of the present invention can be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. Preferably, the moieties suitable for derivatization of the antibody are water-soluble polymers. Non-limiting

5 examples of water-soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propylene

10 glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymer is attached,

15 they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, *etc.*

Pharmaceutical Formulations

20 Therapeutic formulations of the antibodies used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic

25 to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol;

30 cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low-molecular-weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates

including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose, or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™, or polyethylene glycol (PEG).

5 A further formulation and delivery method herein involves that described, for example, in WO 2004/078140, including the ENHANZE™ drug delivery technology (Halozyme Inc.). This technology is based on a recombinant human hyaluronidase (rHuPH20). rHuPH20 is a recombinant form of the naturally occurring human enzyme approved by the FDA that temporarily clears space in the matrix of tissues such as skin. That
10 is, the enzyme has the ability to break down hyaluronic acid (HA), the space-filling "gel"-like substance that is a major component of tissues throughout the body. This clearing activity is expected to allow rHuPH20 to improve drug delivery by enhancing the entry of therapeutic molecules through the subcutaneous space. Hence, when combined or co-formulated with certain injectable drugs, this technology can act as a "molecular machete" to facilitate the
15 penetration and dispersion of these drugs by temporarily opening flow channels under the skin. Molecules as large as 200 nanometers may pass freely through the perforated extracellular matrix, which recovers its normal density within approximately 24 hours, leading to a drug delivery platform that does not permanently alter the architecture of the skin.

20 Hence, the present invention includes a method of delivering an antibody herein to a tissue containing excess amounts of glycosaminoglycan, comprising administering a hyaluronidase glycoprotein (sHASEGP) (this protein comprising a neutral active soluble hyaluronidase polypeptide and at least one N-linked sugar moiety, wherein the N-linked sugar moiety is covalently attached to an asparagine residue of the polypeptide) to the tissue
25 in an amount sufficient to degrade glycosaminoglycans sufficiently to open channels less than about 500 nanometers in diameter; and administering the antibody to the tissue comprising the degraded glycosaminoglycans.

 In another embodiment, the invention includes a method for increasing the diffusion of an antibody herein that is administered to a subject comprising administering to the subject
30 a sHASEGP polypeptide in an amount sufficient to open or to form channels smaller than the diameter of the antibody and administering the antibody, whereby the diffusion of the therapeutic substance is increased. The sHASEGP and antibody may be administered

separately or simultaneously in one formulation, and consecutively in either order or at the same time.

Exemplary anti-LT α antibody formulations are described in WO 1998/56418, which include a liquid multidose formulation comprising the anti-LT α antibody at 40 mg/mL, 25 mM acetate, 150 mM trehalose, 0.9% benzyl alcohol, 0.02% polysorbate 20 at pH 5.0 that has a minimum shelf life of two years storage at 2-8°C. Another anti-LT α formulation of interest comprises 10 mg/mL antibody in 9.0 mg/mL sodium chloride, 7.35 mg/mL sodium citrate dihydrate, 0.7mg/mL POLYSORBATE 80TM surfactant, and Sterile Water for Injection, pH 6.5. Yet another aqueous pharmaceutical formulation comprises 10-30 mM sodium acetate from about pH 4.8 to about pH 5.5, preferably at pH 5.5, POLYSORBATETM as a surfactant in an amount of about 0.01-0.1% v/v, trehalose at an amount of about 2-10% w/v, and benzyl alcohol as a preservative (US 6,171,586). Lyophilized formulations adapted for subcutaneous administration are described, for example, in WO 1997/04801 and US 6,267,958 (Andya *et al.*). Such lyophilized formulations may be reconstituted with a suitable diluent to a high protein concentration and the reconstituted formulation may be administered subcutaneously to the mammal to be treated herein.

Crystallized forms of the antibody are also contemplated. See, for example, US 2002/0136719 (Shenoy *et al.*).

The formulation herein may also contain more than one active compound (a second medicament as noted above) as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, it may be desirable to further provide a cytotoxic agent, chemotherapeutic agent, cytokine antagonist, integrin antagonist, or immunosuppressive agent (*e.g.*, one that acts on T cells, such as cyclosporin or an antibody that binds T cells, *e.g.*, one that binds LFA-1). The type and effective amounts of such second medicaments depend, for example, on the amount of antibody present in the formulation, the type of disease or disorder or treatment, the clinical parameters of the subjects, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as described herein or from about 1 to 99% of the heretofore employed dosages. The preferred such medicaments are noted above.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate)

microcapsules, respectively, in colloidal drug-delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed, for example, in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

5 Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (US 10 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

15 The formulations to be used for *in-vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Uses

20 An antibody of the present invention may be used in, for example, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* therapeutic methods. Antibodies of the invention can be used as an antagonist to partially or fully block the specific LT α activity *in vitro*, *ex vivo*, and/or *in vivo*. Moreover, at least some of the antibodies of the invention can neutralize antigen activity from other species. Accordingly, the antibodies of the invention can be used to inhibit a specific antigen activity, *e.g.*, in a cell culture containing the antigen, in human subjects, or in other mammalian subjects having the antigen with which an antibody of the invention cross-reacts (e.g., chimpanzee, baboon, marmoset, cynomolgus, rhesus, pig, or mouse). In one 25 embodiment, the antibody of the invention can be used for inhibiting antigen activities by contacting the antibody with the antigen such that antigen activity is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule.

30 In one embodiment, an antibody of the invention can be used in a method for inhibiting an antigen in a subject suffering from a disorder in which the antigen activity is detrimental, comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the antigen activity in the subject is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule and the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing the antigen to which an antibody of the invention binds. Still further, the subject

can be a mammal into which the antigen has been introduced (*e.g.*, by administration of the antigen or by expression of an antigen transgene). An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an antigen with which the immunoglobulin cross-reacts (*e.g.*, a primate, pig, or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (*e.g.*, testing of dosages and time courses of administration). The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit, delay progression of, prevent/delay recurrence of, ameliorate, or prevent autoimmune diseases, disorders, or conditions as defined herein.

In one aspect, a blocking antibody of the invention is specific to a ligand antigen, and inhibits the antigen activity by blocking or interfering with the ligand-receptor interaction involving the ligand antigen, thereby inhibiting the corresponding signal pathway and other molecular or cellular events. The invention also features receptor-specific antibodies that do not necessarily prevent ligand binding but interfere with receptor activation, thereby inhibiting any responses that would normally be initiated by the ligand binding. The invention also encompasses antibodies that either preferably or exclusively bind to ligand-receptor complexes. An antibody of the invention can also act as an agonist of a particular antigen receptor, thereby potentiating, enhancing, or activating either all or partial activities of the ligand-mediated receptor activation.

The antibody may be a naked antibody or alternatively is conjugated with another molecule, such as a cytotoxic agent. The antibody is preferably administered intravenously or subcutaneously, most preferably subcutaneously.

In one embodiment, the subject has never been previously treated with drug(s), such as immunosuppressive agent(s), to treat the disorder, and in a particular embodiment has never been previously treated with a TNF antagonist. In an alternative embodiment, the subject has been previously treated with drug(s) to treat the disorder, including with a TNF antagonist.

In a still further aspect, the patient has relapsed with the disorder. In an alternative embodiment, the patient has not relapsed with the disorder.

In another aspect, the antibody herein is the only medicament administered to the subject to treat the disorder. In an alternative aspect, the antibody herein is one of the medicaments used to treat the disorder.

In a further aspect, the subject only has RA as an autoimmune disorder. Alternatively, the subject only has MS as an autoimmune disorder. Still alternatively, the subject only has lupus, or ANCA-associated vasculitis, or Sjögren's syndrome as an autoimmune disorder. In all cases autoimmune disorder is defined above.

5 In a still further embodiment, the subject has an abnormal level of one or more regulatory cytokines, anti-nuclear antibodies (ANA), anti-rheumatoid factor (RF) antibodies, creatinine, blood urea nitrogen, anti-endothelial antibodies, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), infiltrating CD20 cells, anti-double stranded DNA (dsDNA) antibodies, anti-Sm antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-phospholipid antibodies, 10 anti-ribosomal P antibodies, anti-Ro/SS-A antibodies, anti-Ro antibodies, anti-La antibodies, antibodies directed against Sjögren's-associated antigen A or B (SS-A or SS-B), antibodies directed against centromere protein B (CENP B) or centromere protein C (CENP C), autoantibodies to ICA69, anti-Smith antigen (Sm) antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-ribosomal P antibodies, autoantibodies staining the nuclear or perinuclear 15 zone of neutrophils (pANCA), anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, cross-reactive antibodies to GM1 ganglioside or GQ1b ganglioside, anti-acetylcholine receptor (AChR), anti-AChR subtype, or anti-muscle specific tyrosine kinase (MuSK) antibodies, serum anti-endothelial cell antibodies, IgG or anti-desmoglein (Dsg) antibodies, anti-centromere, anti-topoisomerase-1 (Scl-70), anti-RNA polymerase or anti-U3-ribonucleoprotein (U3-RNP) 20 antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-mitochondrial (AMA) or anti-mitochondrial M2 antibodies, anti-thyroid peroxidase (TPO), anti-thyroglobin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-nucleic (AN), anti-actin (AA) or anti-smooth muscle antigen (ASM) antibodies, IgA anti-endomysial, IgA anti-tissue transglutaminase, 25 IgA anti-gliadin or IgG anti-gliadin antibodies, anti-CYP21A2, anti-CYP11A1 or anti-CYP17 antibodies, anti-ribonucleoprotein (RNP), or myositis-specific antibodies, anti-myelin associated glycoprotein (MAG) antibodies, anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies, anti-GM1 ganglioside, anti-sulfate-3-glycuronyl paragloboside (SGPG), or IgM anti-glycoconjugate antibodies, IgM anti-ganglioside antibody, anti-thyroid peroxidase (TPO), 30 anti-thyroglobin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-myelin basic protein or anti-myelin oligodendrocytic glycoprotein antibodies, IgM rheumatoid factor antibodies directed against the Fc portion of IgG, anti-Factor VIII antibodies, or a combination thereof.

The parameters for assessing efficacy or success of treatment of an autoimmune disorder (which includes an autoimmune-related disease) will be known to the physician of skill in the appropriate disease. Generally, the physician of skill will look for reduction in the signs and symptoms of the specific disease. The following are by way of examples.

5 In one embodiment, the methods and compositions of the invention are useful to treat RA. RA is characterized by inflammation of multiple joints, cartilage loss, and bone erosion that leads to joint destruction and ultimately reduced joint function. Additionally, since RA is a systemic disease, it can have effects in other tissues such as the lungs, eyes, and bone marrow.

10 If the subject has RA, which is a preferred indication herein, preferably the antibodies herein induce a major clinical response in the subject.

The antibodies herein can be used as first-line therapy in patients with early RA (*i.e.*, methotrexate (MTX) naive), or in combination with, *e.g.*, MTX or cyclophosphamide. Alternatively, the antibodies can be used in treatment as second-line therapy for patients who were, for example, refractory to DMARD and/or TNF inhibitor, and/or MTX, in combination with, *e.g.*, MTX. The LT α -binding antibodies can also be administered in combination with B-cell mobilizing agents such as integrin antibodies that mobilize B cells into the bloodstream for more effective killing. The LT α -binding antibodies are useful to prevent and control joint damage, delay structural damage, decrease pain associated with inflammation in RA, and generally reduce the signs and symptoms in moderate-to-severe RA. The RA patient can be treated with the LT α antibody prior to, after, or together with treatment with other drugs used in treating RA (see combination therapy described herein). Patients who had previously failed DMARDs and/or had an inadequate response to MTX alone are, in one embodiment, treated with a LT α -binding antibody. In another embodiment, such patients are administered humanized LT α -binding antibody plus cyclophosphamide or LT α -binding antibody plus MTX. Most preferably, the antibodies herein are administered with MTX for treatment of RA, and not with high-dose steroids.

20 One method of evaluating treatment efficacy in RA is based on American College of Rheumatology (ACR) criteria, which are used to measure the percentage of improvement in tender and swollen joints, among other things. The RA patient can be scored at, for example, ACR 20 (20 percent improvement) compared with no antibody treatment (*e.g.*, baseline before treatment) or treatment with placebo. Other ways of evaluating the efficacy of antibody treatment include X-ray scoring such as the Sharp X-ray score used to score

structural damage such as bone erosion and joint space narrowing. Patients can also be evaluated for the prevention of or improvement in disability based on Health Assessment Questionnaire (HAQ) score, AIMS score, or SF-36 at time periods during or after treatment. The ACR 20 criteria may include 20% improvement in both tender (painful) joint count and swollen joint count plus a 20% improvement in at least three of five additional measures:

1. patient's pain assessment by visual analog scale (VAS),
2. patient's global assessment of disease activity (VAS),
3. physician's global assessment of disease activity (VAS),
4. patient's self-assessed disability measured by the Health Assessment Questionnaire, and
5. acute phase reactants, CRP or ESR.

The ACR 50 and 70 are defined analogously. Preferably, the patient is administered an amount of an LT α -binding antibody of the invention effective to achieve at least a score of ACR 20, preferably at least ACR 30, more preferably at least ACR 50, even more preferably at least ACR 70, and most preferably at least ACR 75.

Psoriatic arthritis has unique and distinct radiographic features. For psoriatic arthritis, joint erosion and joint space narrowing can be evaluated by the Sharp score as well. The antibodies disclosed herein can be used to prevent the joint damage as well as reduce disease signs and symptoms of the disorder.

Yet another aspect of the invention is a method of treating lupus, including systemic lupus erythematosus (SLE) and lupus nephritis, by administering to the subject having such disease an effective amount of an antibody of the invention. For example, SLEDAI scores provide a numerical quantitation of disease activity. The SLEDAI is a weighted index of 24 clinical and laboratory parameters known to correlate with disease activity, with a numerical range of 0-103. See Gescuk and Davis, *Current Opinion in Rheumatology*, 14: 515-521 (2002). Antibodies to double-stranded DNA are believed to cause renal flares and other manifestations of lupus. Patients undergoing antibody treatment can be monitored for time to renal flare, which is defined as a significant, reproducible increase in serum creatinine, urine protein, or blood in the urine. Alternatively or in addition, patients can be monitored for levels of antinuclear antibodies and antibodies to double-stranded DNA. Treatments for SLE include high-dose corticosteroids and/or cyclophosphamide (HDCC).

Spondyloarthropathies are a group of disorders of the joints, including ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and Crohn's disease. Treatment success can be determined by validated patient and physician global assessment measuring tools.

Various medications are used to treat psoriasis; treatment differs directly in relation to disease severity. Patients with a more mild form of psoriasis typically utilize topical treatments, such as topical steroids, anthralin, calcipotriene, clobetasol, and tazarotene, to manage the disease, while patients with moderate and severe psoriasis are more likely to employ systemic (methotrexate, retinoids, cyclosporine, PUVA, and UVB) therapies. Tars are also used. These therapies are disadvantageous due to safety concerns, time-consuming regimens, and/or inconvenient processes of treatment. Furthermore, some require expensive equipment and dedicated space in the office setting. Such systemic medications can produce serious side effects, including hypertension, hyperlipidemia, bone-marrow suppression, liver disease, kidney disease, and gastrointestinal upset. Also, the use of phototherapy can increase the incidence of skin cancers. In addition to the inconvenience and discomfort associated with the use of topical therapies, phototherapy and such systemic treatments also require cycling patients on and off therapy and monitoring lifetime exposure due to their side effects.

Treatment efficacy for psoriasis is assessed by monitoring changes in clinical signs and symptoms of the disease, including Physician's Global Assessment (PGA) changes, Psoriasis Area and Severity Index (PASI) scores, and Psoriasis Symptom Assessment (PSA), compared with the baseline condition. The patient can be measured periodically throughout treatment on the Visual Analog Scale (VAS) used to indicate the degree of itching experienced at specific time points.

Assays

Ligand/receptor binding studies may be carried out in any known assay method, such as competitive-binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Cell-based assays and animal models can be used to understand the interaction between the ligands and receptors identified herein and the development and pathogenesis of the conditions and diseases referred to herein.

In one approach, mammalian cells may be transfected with the ligands or receptors described herein, and the ability of the antibody herein to inhibit binding or activity is analyzed. Suitable cells can be transfected with the desired gene, and monitored for activity.

Such transfected cell lines can then be used to test the ability of antibody, for example, to modulate LT $\alpha\beta$ complex expression of the cells.

In addition, primary cultures derived from transgenic animals can be used in the cell-based assays. Techniques to derive continuous cell lines from transgenic animals are well known in the art. See, *e.g.*, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:642-648 (1985).

One suitable cell-based assay is the addition of epitope-tagged ligand (*e.g.*, LT α) to cells that have or express the respective receptor, and the analysis of binding (in the presence or absence of prospective antibodies) by FACS staining with anti-tag antibody. In another assay, the ability of the antibody herein to inhibit the expression of LT $\alpha\beta$ complex on cells expressing such complex is assayed. For example, suitable expressing cell lines are cultured in the presence or absence of prospective antibodies and the modulation of LT $\alpha\beta$ complex expression can be measured by ^3H -thymidine incorporation or cell number.

The results of the cell-based *in vitro* assays can be further verified using *in vivo* animal models. Many animal models can be used to test the efficacy of the antibodies identified herein in relation to, for instance, immune-related disease. The *in vivo* nature of such models makes them particularly predictive of responses in human patients. Animal models of immune-related diseases include both non-recombinant and recombinant (transgenic) animals. Non-recombinant animal models include, for example, rodent, *e.g.*, murine models. Such models can be generated by introducing cells into syngeneic mice using standard techniques, *e.g.* subcutaneous injection, tail-vein injection, spleen implantation, intraperitoneal implantation, and implantation under the renal capsule.

Graft-versus-host disease is an example of a disease for which an animal model has been designed. Graft-versus-host disease occurs when immunocompetent cells are transplanted into immunosuppressed or tolerant patients. The donor cells recognize and respond to host antigens. The response can vary from life-threatening severe inflammation to mild cases of diarrhea and weight loss. Graft-versus-host disease models provide a means of assessing T-cell reactivity against MHC antigens and minor transplant antigens. A suitable procedure is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, Eds. Cologan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc., 1994), unit 4.3.

An animal model for skin allograft rejection tests the ability of T cells to mediate *in vivo* tissue destruction to measure their role in anti-viral immunity, and is described, for example, in *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unit 4.4. Other transplant rejection models useful to test the antibodies herein include the allogeneic heart-transplant models

described by Tanabe *et al.*, *Transplantation*, 58:23 (1994) and Tinubu *et al.*, *J. Immunol.*, 4330-4338 (1994).

Animal models for delayed-type hypersensitivity provide an assay of cell-mediated immune function. Delayed-type hypersensitivity reactions are a T-cell-mediated *in vivo* immune response characterized by inflammation that does not reach a peak until after a period of time has elapsed after challenge with an antigen. These reactions also occur in tissue-specific autoimmune diseases such as MS and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE, a model for MS). A suitable, exemplary model is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unit 4.5.

The collagen-induced arthritis (CIA) model is considered a suitable model for studying potential drugs or biologics active in human arthritis because of the many immunological and pathological similarities to human RA, the involvement of localized major histocompatibility, complete class-II-restricted T-helper lymphocyte activation, and the similarity of histological lesions. Features of this CIA model that are similar to that found in RA patients include: erosion of cartilage and bone at joint margins (as can be seen in radiographs), proliferative synovitis, and symmetrical involvement of small and medium-sized peripheral joints in the appendicular, but not the axial, skeleton. Jamieson *et al.*, *Invest. Radiol.* 20: 324-9 (1985). Furthermore, IL-1 and TNF- α appear to be involved in CIA as well as in RA. Joosten *et al.*, *J. Immunol.* 163: 5049-5055 (1999). TNF-neutralizing antibodies, and separately, TNFR.Fc, reduced the symptoms of RA in this model (Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9784-9788 (1992); Wooley *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 6602-6607 (1993)).

In this model for RA, type II collagen is purified from bovine articular cartilage (Miller, *Biochemistry* 11:4903 (1972)) and used to immunized mice (Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2762 (1994)). Symptoms of arthritis include erythema and/or swelling of the limbs as well as erosions or defects in cartilage and bone as determined by histology. This widely used model is also described, for example, by Holmdahl *et al.*, *APMIS*, 97:575 (1989), in *Current Protocols in Immunology*, *supra*, units 15.5, and in Issekutz *et al.*, *Immunology*, 88:569 (1996).

A model of asthma has been described in which antigen-induced airway hyper-reactivity, pulmonary eosinophilia, and inflammation are induced by sensitizing an animal with ovalbumin and challenging the animal with the same protein delivered by aerosol. Animal models such as rodent and non-human primate models exhibit symptoms similar to

atopic asthma in humans upon challenge with aerosol antigens. Suitable procedures to test the antibodies herein for suitability in treating asthma include those described by Wolyniec *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 18:777 (1998).

Additionally, the antibodies herein can be tested in the SCID/SCID mouse model for immune disorders. For example, as described by Schon *et al.*, *Nat. Med.*, 3:183 (1997), the mice demonstrate histopathologic skin lesions resembling psoriasis. Another suitable model is the human skin/SCID mouse chimera prepared as described by Nickoloff *et al.*, *Am. J. Path.*, 146:580 (1995).

Dosage

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with a second medicament as noted below) will depend, for example, on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The dosage is preferably efficacious for the treatment of that indication while minimizing toxicity and side effects.

The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 µg/kg to 500 mg/kg (preferably about 0.1 mg/kg to 400 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. One typical daily dosage might range from about 1 µg/kg to 500 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. One exemplary dosage of the antibody would be in the range from about 0.05 mg/kg to about 400 mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg or 10 mg/kg or 50 mg/kg or 100 mg/kg or 300 mg/kg or 400 mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, *e.g.*, every week or every three weeks (*e.g.*, such that the patient receives from about two to about twenty, *e.g.*, about six doses of the antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses, may be administered. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 to 500 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 to 400 mg/kg of

the antibody. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

For the treatment of an autoimmune disorder, the therapeutically effective dosage will typically be in the range of about 50 mg/m² to about 3000 mg/m², preferably about 50 to 1500 mg/m², more preferably about 50-1000 mg/m². In one embodiment, the dosage range is about 125-700 mg/m². For treating RA, in one embodiment, the dosage range for the humanized antibody is about 50 mg/m² or 125 mg/m² (equivalent to about 200 mg/dose) to about 1000 mg/m², given in two doses, e.g., the first dose of about 200 mg is administered on day one followed by a second dose of about 200 mg on day 15. In different embodiments, the dosage is about any one of 50 mg/dose, 80 mg/dose, 100 mg/dose, 125 mg/dose, 150 mg/dose, 200 mg/dose, 250 mg/dose, 275 mg/dose, 300 mg/dose, 325 mg/dose, 350 mg/dose, 375 mg/dose, 400 mg/dose, 425 mg/dose, 450 mg/dose, 475 mg/dose, 500 mg/dose, 525 mg/dose, 550 mg/dose, 575 mg/dose, or 600 mg/dose, or 700 mg/dose, or 800 mg/dose, or 900 mg/dose, or 1000 mg/dose, or 1500 mg/dose.

In treating disease, the LT α -binding antibodies of the invention can be administered to the patient chronically or intermittently, as determined by the physician of skill in the disease.

A patient administered a drug by intravenous infusion or subcutaneously may experience adverse events such as fever, chills, burning sensation, asthenia, and headache. To alleviate or minimize such adverse events, the patient may receive an initial conditioning dose(s) of the antibody followed by a therapeutic dose. The conditioning dose(s) will be lower than the therapeutic dose to condition the patient to tolerate higher dosages.

The antibodies herein may be administered at a frequency that is within the skill and judgment of the practicing physician, depending on various factors noted above, for example, the dosing amount. This frequency includes twice a week, three times a week, once a week, bi-weekly, or once a month. In a preferred aspect of this method, the antibody is administered no more than about once every other week, more preferably about once a month.

Route of administration

The antibodies used in the methods of the invention (as well as any second medicaments) are administered to a subject or patient, including a human patient, in accord with suitable methods, such as those known to medical practitioners, depending on many factors, including whether the dosing is acute or chronic. These routes include, for example, parenteral, intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period

of time, by subcutaneous, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, intrapulmonary, intracerebrospinal, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, intralesional, or inhalation routes (e.g., intranasal). Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Preferred routes herein are intravenous or subcutaneous administration, most preferably subcutaneous.

In one embodiment, the antibody herein is administered by intravenous infusion, and more preferably with about 0.9 to 20% sodium chloride solution as an infusion vehicle.

Combination Therapy

In any of the methods herein, one may administer to the subject or patient along with the antibody herein an effective amount of a second medicament (where the antibody herein is a first medicament), which is another active agent that can treat the condition in the subject that requires treatment; for example, if the condition is an autoimmune disorder, the second medicament is a drug that can treat the autoimmune disorder, alone or with another active agent. For treatment of autoimmune disorders, the second medicament includes, for example, a chemotherapeutic agent, an immunosuppressive agent, an antagonist (such as an antibody) that binds a B-cell surface marker such as rituximab or humanized 2H7, a BAFF antagonist, a DMARD, a cytotoxic agent, an integrin antagonist such as a CD11 or CD18 antagonist including CD11a or CD18 antibodies, e.g., efalizumab (RAPTIVA®), a NSAID, a cytokine antagonist, such as a TNF antagonist, an anti-rheumatic agent, a muscle relaxant, a narcotic, an analgesic, an anesthetic, a sedative, a local anesthetic, a neuromuscular blocker, an antimicrobial, an antipsoriatic, a corticosteroid, an anabolic steroid, an erythropoietin, an immunizing agent, an immunoglobulin, a radiopharmaceutical, an antidepressant, an antipsychotic, a stimulant, an asthma medication, a beta agonist, an inhaled steroid, an epinephrine, a cytokine, cells for repressing B-cell autoantibody secretion as set forth in WO 2005/027841, a hyaluronidase glycoprotein as an active delivery vehicle as set forth in, for example, WO 2004/078140, or a combination thereof.

For treatment of proliferative diseases such as cancer, the second medicament would include, for example, chemotherapeutic agents, hormones, cytotoxic agents, and other biologics such as antibodies to HER-2, to VEGF, to B-cell surface antigens such as TAHO antigen (e.g., US 2006/0251662), CD20, and CD22, and to EGF/EGF-R.

Preferably, such second medicament for autoimmune diseases is an immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker (such as an

antibody, e.g., CD20 antibody or CD22 antibody), a BAFF antagonist, a DMARD, an integrin antagonist, a hyaluronidase glycoprotein (as an active delivery vehicle), a NSAID, a cytokine antagonist, more preferably a TNF (*e.g.*, TNF- α), CD11, or CD18 antagonist, or a combination thereof. More preferably, it is methotrexate, a TNF antagonist, an antagonist to a B-cell surface marker, or a DMARD.

The type of such second medicament depends on various factors, including the type of autoimmune disorder, the severity of the disease, the condition and age of the patient, the type and dose of first medicament employed, *etc.*

The antibodies herein can be administered concurrently, sequentially, or alternating with the second medicament or upon non-responsiveness with other therapy. Thus, the combined administration of a second medicament includes co-administration (concurrent administration), using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) medicaments simultaneously exert their biological activities. All these second medicaments may be used in combination with each other or by themselves with the first medicament, so that the expression "second medicament" as used herein does not mean it is the only medicament besides the first medicament, respectively. Thus, the second medicament need not be one medicament, but may constitute or comprise more than one such drug.

These second medicaments as set forth herein are generally used in the same dosages and with the same administration routes as the first medicaments, or from about 1 to 99% of the dosages of the first medicaments. If such second medicaments are used at all, preferably, they are used in lower amounts than if the first medicament were not present, especially in subsequent dosings beyond the initial dosing with the first medicament, so as to eliminate or reduce side effects caused thereby.

For the treatment of RA, for example, the patient can be treated with an antibody of the invention in conjunction with any one or more of the following drugs: integrin antagonists, DMARDs (*e.g.*, MTX), NSAIDs, cytokine inhibitors such as HUMIRATM (adalimumab; Abbott Laboratories), ARAVA® (leflunomide), REMICADE® (infliximab; Centocor Inc., of Malvern, Pa), ENBREL® (etanercept; Immunex, WA), corticosteroids, or COX-2 inhibitors. DMARDs commonly used in RA include hydroxychloroquine, sulfasalazine, methotrexate, leflunomide, etanercept, infliximab, azathioprine, D-penicillamine, Gold (oral), Gold (intramuscular), minocycline, cyclosporine, or

Staphylococcal protein A immunoadsorption. Adalimumab is a human monoclonal antibody that binds to TNF α . Infliximab is a chimeric monoclonal antibody that binds to TNF α . Etanercept is an "immunoadhesin" fusion protein consisting of the extracellular ligand binding portion of the human 75 kD (p75) tumor necrosis factor receptor (TNFR) linked to the Fc portion of a human IgG1. For conventional treatment of RA, see, e.g., American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, *Arthritis & Rheumatism* 46(2): 328-346 (2002). In a specific embodiment, the RA patient is treated with an LT α antibody of the invention in conjunction with MTX. An exemplary dosage of MTX is about 7.5–25 mg/kg/wk. MTX can be administered orally and subcutaneously.

For the treatment of ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and Crohn's disease, the patient can be treated with an antibody of the invention in conjunction with, for example, REMICADE® (infliximab; from Centocor Inc., Malvern, PA) or ENBREL® (etanercept; Amgen, CA).

Treatments for SLE include high-dose corticosteroids and/or cyclophosphamide (HDCC) in conjunction with the antibodies herein.

For the treatment of psoriasis, patients can be administered a LT α -binding antibody in conjunction with topical treatments, such as topical steroids, anthralin, calcipotriene, clobetasol, and tazarotene, or with MTX, retinoids, cyclosporine, PUVA and UVB therapies, and integrin antagonists such as anti-CD11a or anti-CD18 antibodies, including, e.g., efalizumab (RAPTIVA®). In one embodiment, the psoriasis patient is treated with the LT α -binding antibody sequentially or concurrently with cyclosporine or with efalizumab.

In certain embodiments, an immunoconjugate comprising the antibody herein conjugated with a cytotoxic agent is administered to the patient. In some embodiments, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the target cell to which it binds. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in the target cell. Examples of such cytotoxic agents include any of the chemotherapeutic agents noted herein (such as a maytansinoid or a calicheamicin), a radioactive isotope, a ribonuclease, or a DNA endonuclease.

Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, articles of manufacture containing materials useful for the treatment of the disorders described above are provided. In one aspect, the article of manufacture comprises (a) a container comprising the antibodies herein (preferably

the container comprises the antibody and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent within the container); and (b) a package insert with instructions for treating the disorder in a patient.

In a preferred embodiment, the article of manufacture herein further comprises a
5 container comprising a second medicament, wherein the antibody is a first medicament. This article further comprises instructions on the package insert for treating the patient with the second medicament, in an effective amount. The second medicament may be any of those set forth above, with an exemplary second medicament being an antagonist binding to a B-cell surface marker (*e.g.*, a CD20 antibody), a BAFF antagonist, an immunosuppressive agent,
10 including MTX and corticosteroids, an integrin antagonist, a cytokine antagonist such as a TNF, CD11, or CD18 antagonist, or a combination thereof. The preferred second medicaments are a steroid, a cytokine antagonist, and/or an immunosuppressive agent.

In this aspect, the package insert is on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, *etc.* The containers may be formed
15 from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds or contains a composition that is effective for treating the disorder in question and may have a sterile access port (for example, the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is the antibody herein. The label or package insert indicates that the
20 composition is used for treating the particular disorder in a patient or subject eligible for treatment with specific guidance regarding administration of the compositions to the patients, including dosing amounts and intervals of antibody and any other medicament being provided. Package insert refers to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products that contain information about the indications, usage, dosage,
25 administration, contra-indications, and/or warnings concerning the use of such therapeutic products. The article of manufacture may further comprise an additional container comprising a pharmaceutically acceptable diluent buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution, and/or dextrose solution. The article of manufacture may further include other materials desirable from a commercial and
30 user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

In a specific embodiment of the invention, an article of manufacture is provided comprising, packaged together, a pharmaceutical composition comprising an antibody herein and a pharmaceutically acceptable carrier and a label stating that the antibody or

pharmaceutical composition is indicated for treating patients with an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or IBD.

In a preferred embodiment the article of manufacture herein further comprises a container comprising a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, and which article further comprises instructions on the package insert for treating the patient with the second medicament, in an effective amount. The second medicament may be any of those set forth above, with an exemplary second medicament being those set forth above, including, especially for RA treatment, an immunosuppressive agent, a corticosteroid, a DMARD, an integrin antagonist, a NSAID, a cytokine antagonist, a bisphosphonate, or a combination thereof, more preferably a DMARD, NSAID, cytokine antagonist, integrin antagonist, or immunosuppressive agent. Most preferably, the second medicament is methotrexate or a DMARD if the disease is RA.

In another aspect, the invention provides a method for packaging or manufacturing an antibody herein or a pharmaceutical composition thereof comprising combining in a package the antibody or pharmaceutical composition and a label stating that the antibody or pharmaceutical composition is indicated for treating patients with an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or IBD.

Methods of Advertising

The invention herein also encompasses a method for advertising an antibody herein or a pharmaceutically acceptable composition thereof comprising promoting, to a target audience, the use of the antibody or pharmaceutical composition thereof for treating a patient or patient population with an autoimmune disease such as RA, MS, lupus, or IBD.

Advertising is generally paid communication through a non-personal medium in which the sponsor is identified and the message is controlled. Advertising for purposes herein includes publicity, public relations, product placement, sponsorship, underwriting, and sales promotion. This term also includes sponsored informational public notices appearing in any of the print communications media designed to appeal to a mass audience to persuade, inform, promote, motivate, or otherwise modify behavior toward a favorable pattern of purchasing, supporting, or approving the invention herein.

The advertising and promotion of the treatment methods herein may be accomplished by any means. Examples of advertising media used to deliver these messages include television, radio, movies, magazines, newspapers, the internet, and billboards, including commercials, which are messages appearing in the broadcast media. Advertisements also

include those on the seats of grocery carts, on the walls of an airport walkway, and on the sides of buses, or heard in telephone hold messages or in-store PA systems, or anywhere a visual or audible communication can be placed, generally in public places. More specific examples of promotion or advertising means include television, radio, movies, the internet
 5 such as webcasts and webinars, interactive computer networks intended to reach simultaneous users, fixed or electronic billboards and other public signs, posters, traditional or electronic literature such as magazines and newspapers, other media outlets, presentations or individual contacts by, *e.g.*, e-mail, phone, instant message, postal, courier, mass, or carrier mail, in-person visits, *etc.*

10 The type of advertising used will depend on many factors, for example, on the nature of the target audience to be reached, *e.g.*, hospitals, insurance companies, clinics, doctors, nurses, and patients, as well as cost considerations and the relevant jurisdictional laws and regulations governing advertising of medicaments. The advertising may be individualized or customized based on user characterizations defined by service interaction and/or other data
 15 such as user demographics and geographical location.

The following are non-limiting examples of the methods and compositions of the invention. It is understood that various other embodiments may be practiced, given the general description provided above. The disclosures of all citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

20 **EXAMPLE 1: Preparation of anti-human and anti-murine LT α monoclonal antibodies and hamster-murine chimeras**

Anti-human LT α monoclonal antibodies 2C8 and 3F12 were generated as follows: BALB/c mice (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) were hyperimmunized by
 25 injection with 5 μ g/dose of purified recombinant human LT α expressed in *E. coli* (Genentech, Inc., South San Francisco, CA; Genentech Lot# 8360-2B; see also Spriggs, "Tumor Necrosis Factor: Basic Principles and Preclinical Studies," *Biologic Therapy of Cancer*, DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company (1991) Ch. 16, pp. 354-377; Ruddle, *Current Opinion in Immunology*, 4:327-332 (1992); Wong *et al.*, "Tumor Necrosis Factor,"
 30 *Human Monocytes*, Academic Press (1989), pp. 195-215; Aggarwal *et al.*, *Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation*, Wiley-Liss, Inc. 1990, pp. 375-384; and Paul *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 6:407-438 (1988)) in DETOXTM adjuvant (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MO). Specifically, 10 μ g LT α 3 was mixed with 50 μ L of the adjuvant and injected subcutaneously into the rear footpads of mice (strain

BALB/c) on days 1, 4, 15, 29, 41, 56, and 71. Serum was collected on Days 15 and 56 for detection of anti-LT α 3-specific antibodies by binding ELISA.

On day 75, the animals were sacrificed, spleens were harvested, and 3×10^7 cells were fused with 5×10^7 cells of the mouse myeloma line X63-Ag8.653 using 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 by an established procedure (Oi and Herzenberg, in *Selected Methods in Cellular Immunology*, B. Mishel and S. Schiigi, eds., (W.J. Freeman Co., San Francisco, CA, 1980)). The fused cells were plated into 96-well microtiter plates at a density of 2×10^5 cells/well containing HAT medium for selection (Littlefield, *Science*, 145:709 (1964)). After 12 days, the supernatants were harvested and screened for antibody production by direct ELISA. The supernatants harvested from each hybridoma lineage were purified by affinity chromatography (Pharmacia fast protein liquid chromatography (FPLC); Pharmacia, Uppsala, Sweden). The purified antibody preparations were then sterile filtered (0.2- μ m pore size; Nalgene, Rochester NY) and stored at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS).

Anti-murine LT α monoclonal antibody S5H3 was generated as follows: Armenian hamsters were immunized with recombinant mouse LT α 2 β 1 (R&D Systems Inc. (1008-LY)). The hamsters were immunized with 2 μ g of antigen by footpad for 12 injections, with an IP boost of 2 μ g of antigen once. The lymph nodes and spleen were fused by PEG treatment. Primary screening was done by ELISA on Immunogen- vs. Genentech-manufactured murine LT α -6His (murine LT α with six histidines attached at the C-terminal end). Detection was done with peroxidase-conjugated AFFINIPURETM goat anti-Armenian hamster IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch 127-035-160). Secondary screening was performed by FACS on irrelevant transfected HEK 293 cells vs. HEK 293 cells stably transfected with murine LT α β (under G418 selection). Detection was performed using R-phycoerythrin-conjugated AFFINIPURETM F(ab')₂ goat anti-Armenian hamster IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch 127-116-160). The hybridoma from which this antibody was derived was deposited with ATCC as Deposit No. PTA-7538 (hybridoma murine Lymphotoxin alpha2 beta1 s5H3.2.2).

All anti-murine and anti-human LT α antibodies generated in these experiments were selected for recognition of LT α 3. These were then screened for (a) blocking of binding of LT α 3 to TNFR1 and TNFR11 by ELISA, (b) binding of LT α β by ELISA and FACS of cells stably transfected with LT α and LT β , and (c) blocking of LT α β interaction with the LT β receptor by ELISA. Antibodies 3F12, 2C8, and S5H3 were selected because they all bound and neutralized LT α 3 and LT α β .

For use in the murine *in vivo* studies described below, the hamster anti-murine LT α hybridoma was cloned as a hamster/mouse chimera. Total RNA was extracted from S5H3 hybridoma cells using a RNEASY MINITM kit (Qiagen) and the manufacturer's suggested protocol. RT-PCR was accomplished using a Qiagen ONE-STEPTM kit, and primers were
 5 designed to amplify the light- and heavy-chain variable domains and add restriction enzyme sites for cloning.

For construction of the light chain of this chimeric antibody S5H3, two sequential cloning steps were used. In the first step, RT-PCR, *Cla*I and *Asc*I sites were added, using primer set one, allowing cloning into a pRK-based vector simply to amplify DNA for
 10 sequencing. After the DNA sequence of the light-chain variable domain was obtained, a round of PCR was performed, using this plasmid as template, in order to add *Eco*RV and *Kpn*I sites that are compatible with the expression vector.

For construction of the heavy chain of S5H3, likewise two cloning steps were used. Specifically, RT-PCR was used to amplify cDNA and add *Cla*I and *Asc*I sites for cloning into
 15 a vector for sequencing. Subsequently, this plasmid was used as template for PCR to add *Bst*WI and *Apa*I sites that are compatible with the expression vector.

For RT-PCR, the primers used were as follows:

S5H3 light-chain set one:

5' primer: GGA TCA TCG ATA CAR CTN GTV YTN CAN CAR TCN CC (SEQ ID

20 NO:56)

3' primer: GGT AAC GGC GCG CCG YTC AGA AGA TGG TGG RAA (SEQ ID NO:57)

S5H3 light-chain set two:

5' primer: GGA TCC GAT ATC CAG CTG GTA TTG ACC CAA TCT

25 (SEQ ID NO:58)

3' primer: GGA TCA GGT ACC GCT GCC AAA AAC ACA CGA CCC (SEQ ID NO:59)

S5H3 heavy chain set one:

5' primer: TGA TAA TCG ATG ARG TNC CAT TTR GTN GAR (SEQ ID NO:60)

30 3' primer: TAG TAA GGC GCG CCT GGT CAG GGA NCC NGA RTT CCA (SEQ ID NO:61)

S5H3 heavy chain set two:

5' primer: TGA TCG CGT ACG CTG AGG TTC AAT TGG TTG AG (SEQ ID NO:62)

3' primer: TGA TCG TGG GCC CTT TGT TGT GGC TGA GGA GAC GG (SEQ ID NO:63) wherein R = A or G, Y = C or T, and N = all four nucleic acids A, G, C, and T.

5 Purified PCR products for the light-chain variable domain were cloned into a pRK mammalian cell expression vector (pRK.LPG2.mukappa) containing the murine kappa constant domain. For the heavy chain, PCR products were cloned into a pRK mammalian cell expression vector (pRK.LPG10.muIgG2a) encoding the murine CH1, hinge, CH2, and CH3 domains of murine isotype IgG2a. These vectors are derivatives of previously described
10 vectors for expression of IgGs in 293 cells (Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604 (2000) and Gorman *et al.*, *DNA Prot Eng Tech*, 2:3-10 (1990)). For S5H3 chimeric antibody expression, the plasmids for the light and heavy chains were transiently co-transfected into 293 cells (an adenovirus-transformed human embryonic kidney cell line (Graham *et al.*, *J.Gen. Virol.*, 36:59-74 (1977)) or CHO cells. The antibody protein was purified from cell-
15 culture supernatants by protein A affinity chromatography.

The LT α 3 binding ELISA was carried out as follows: Microtiter wells were coated with a 1 μ g/ml LT α 3 in 50 mM carbonate buffer solution (50 μ L/well) overnight. The unadsorbed solution was aspirated from the wells. Wells were blocked with 200 μ L PBS containing 5 mg/ml bovine serum albumin (PBS-BSA) for 2 hours. 50 μ L of test sample
20 appropriately diluted in PBS-BSA was added to each well, incubated for one hour, and washed with PBS containing 0.05% TWEEN-20TM surfactant. 100 μ L of horse radish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG in PBS-BSA buffer was added to each well and incubated for one hour. Each well was washed with PBS/0.05%TWEEN-20TM surfactant and then citrate phosphate buffer, pH 5, containing 0.1 mg o-phenylenediamine/ml (substrate
25 solution), and aqueous 30% H₂O₂ was added to each well. The wells were incubated for 30 minutes; then the reaction was stopped with 50 μ L 2.5M sulfuric acid H₂SO₄, and absorbance was read at 490 nm.

The LT α 3-blocking ELISA, the LT α β -binding ELISA and FACS assays, and the LT α β -blocking ELISA were carried out by procedures described further below.

EXAMPLE 2: Sequencing, humanization, and affinity maturation of anti-LT α antibody 3F12

1. *De novo* sequencing of anti-LT α 3F12 using LTQ-FTMS-MS/MS analysis and Edman degradation

5 Because the hybridoma cell line 3F12.2D3 was lost from the frozen cell line bank, anti-LT α monoclonal antibody protein, purified from ascites 3F12.2D3, was submitted for sequencing at a concentration of about 3.0 mg/mL in PBS. The antibody (Ab) was separated on 4-20% TRISTM HCl SDS-PAGE under reducing conditions and each resolved heavy chain (HC) and light chain (LC) was subjected to N-terminal sequencing (25-30 residues were
10 sequenced) to establish monoclonality. The HC was found to be blocked with a pyroglutamyl group that made the N-terminal amino acid inaccessible to Edman sequencing. The blocking group was subsequently removed using the pyroglutamate aminopeptidase enzyme (PGAP) and the HC chain subjected to sequencing again. Both the HC and LC were confirmed to be monoclonal. The Ab was then treated with various enzymatic and chemical
15 cleavages according to a strategy described in *Analytical Biochemistry*, 35:77-86 (2006). In brief, these consisted of the enzymes trypsin, endo Lys-C, Asp-N, and chemical treatments with CNBr and dilute acid (Asp/Pro cleavage).

Chemical cleavages generated a mixture of peptides that were sequenced on model 494 PROCISETM sequencers and identified using Genentech's SEQSORT program
20 (SEQSORT is a utility program designed to make the output produced by the programs in Pittsburgh Supercomputing Center's sequence analysis suite more manageable and readable). These chemical cleavages allowed identification of the constant region of the HC and LC by identity with antibodies in protein sequence databases. Peptides generated from the enzymatic digestions were collected from capillary RP-HPLC separations and the peptide
25 masses measured using MALDI-TOF analysis. Peptides with masses that did not match the constant regions were subjected to further analysis using Edman degradation or liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on an LTQ-FT mass spectrometer. Sequences of the variable regions of the HC and LC were derived from peptides with overlapping sequences obtained by the various proteolytic cleavages.

30 For analysis of the peptides by LC-MS/MS a micro-capillary C18 reverse-phase chromatography column (0.15 x 150 mm i.d., 5 μ m, 300Å) was employed using a flow rate of 1 μ L/minute on an AGILENTTM 1100 series capillary LC system. Solvent A was applied, and a gradient from 2 to 80% solvent B was applied, solvent A consisting of 0.1% v/v formic

acid in water and solvent B consisting of 0.1% v/v formic acid in acetonitrile. The LC was coupled in-line with the LTQ-FT mass spectrometer, and peptides with m/z between 350 and 1800 were analyzed in data-dependent mode with the five most abundant species in each full mass range survey scan being selected for collision-induced dissociation (CID). The resulting CID spectra were screened with the search program MASCOT to find exact matches to database sequences, and potentially novel sequences were determined by manual *de novo* interpretation. Peptides that could not be completely sequenced or that contained the isobaric amino acid pairs of leucine/isoleucine and glutamine/lysine were analyzed further using Edman degradation.

A Fab portion of anti-LT α was obtained from papain digestion of the intact antibody followed by size-exclusion chromatography. Masses of both heavy-chain and light-chain components of the Fab were obtained by quadruple-TOF mass spectrometry after inter-chain disulfides were reduced. The experimental masses corresponded to those calculated based on the obtained sequences of the heavy chain and light chain to within 0.5 Da each.

Sequence of anti-LT α light chain for chimera 3F12.2D3:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKLEIKRA
DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ
DSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID

NO:64)

Sequence of anti-LT α heavy-chain variable region spanning into constant region for chimera 3F12.2D3:

QQQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPGSGS
TNYNEEFKGGKATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDQAVYYCADGYHGYWGQGTTLTV
SSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESTVTWNSGSLSSSVHTFPAL
LQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTTVDDKKLEPSGPIST (SEQ ID

NO:65)

wherein N is any amino acid.

Figure 1C shows the light-chain variable region for this clone, as well as the light-chain constant region as filled in by homology with other antibodies, but not itself sequenced. Figure 1D shows the heavy-chain variable region for this clone, as well as the heavy-chain constant region as filled in by homology with other antibodies.

2. Synthesis of DNA encoding the derived amino acid sequence of chimeric 3F12

Using a pRK-based plasmid containing the gene for the light-chain of anti-TGF-beta monoclonal antibody 2G7 (WO 2005/97832) as a template, and the amino acid sequences derived above, several rounds of oligonucleotide-directed mutagenesis were performed to derive the gene for the light chain of chimeric antibody 3F12. Similarly, the heavy chain of monoclonal antibody 2G7 was the template for construction of the heavy chain of 3F12. Both light- and heavy-chain templates contained the human constant domains, C kappa for the light chain, and CH1, hinge, CH2, and CH3 of IgG1 isotype, for the heavy chain. The oligonucleotides used in the synthesis are given below for the light and heavy chains.

Oligonucleotides for synthesis of chimeric light chain of 3F12:

CA1845

GCT CAT AGT GAC CTT TTC TCC AAC AGA CAC AGC CAG AGA TGA TGG CGA
CTG TGA CAT CAC GAT ATC TGA ATG TAC TCC (SEQ ID NO:66)

CA1846

GCT GTA AGT CCA GTC AAA GTC TTT TAT ACA GTA CCA ATC AGA AGA ACT
TCT TGG CCT GGT ACC AGC (SEQ ID NO:67)

CA1847

GCG ATC AGG GAC ACC AGA TTC CCT AGT GGA TGC CC (SEQ ID NO:68)

CA1848

GCC ACG TCT TCA GCT TTT ACA CTG CTG ATG G (SEQ ID NO:69)

CA1849

GGT CCC CCC TCC GAA CGT GCG CGG GTA GGA GTA GTA TTG CTG ACA GTA
ATA AAC TGC CAG GTC (SEQ ID NO:70)

Oligonucleotides for synthesis of chimeric heavy chain of 3F12:

CA1850

GCT GCA GCT GAC CTT CTG AAT GTA CTC C (SEQ ID NO:71)

CA1851

GCC TTG CAG GAG ATC TTC ACT GAA GCC CCA GGC TTC ATC AGC TCA GCT
CC (SEQ ID NO:72)

CA1852

CCC ACT CTA TCC AGT AAC TAG AGA AGG TGT ATC CAG TAG CCT TGC AGG
(SEQ ID NO:73)

CA1853

CCA CTT CCA GGA CTA ATC TCT CCA ATC CAC TCA AGG CCA TGT CCA GGC C
(SEQ ID NO:74)

CA1854
GCC CTT GAA CTC CTC ATT GTA ATT AGT ACT ACC ACT TCC AGG (SEQ ID
NO:75)

5 CA1855
CCG CAG AGT CCT CAG ATG TGA TCA GGC TGC TGA GCT GGA TGT AGG CAG
TGT TGG AGG ATT TGT CTG CAG TGA ATG TTG CCT TGC C (SEQ ID NO:76)

10 CA1856
GGC TGA GGA GAC GGT GAC TGT GGT GCC TTG GCC CCA GTA GCC ATG GTA
CCC GTC TGC ACA GTA ATA GAC CTC (SEQ ID NO:77)

15 CA1871
CCA GAC TGC TGC AGC TGA CCT TGT GAA TGT ACT CCA GTT GC (SEQ ID
NO:78)

Since the original 3F12 murine monoclonal antibody had the isotype of IgG2b, the murine constant domains for the light and heavy chains of this isotype were swapped for the human constant domains in the chimera, giving a fully murine antibody. For comparison, the murine IgG2a isotype was also constructed. DNA for the light and heavy chain of each
20 variant was co-transfected into an adenovirus-transformed human embryonic kidney cell line, 293, for transient expression, and protein was purified from conditioned media using Protein A affinity chromatography. Binding to LT α in an ELISA format was compared between the original 3F12 monoclonal antibody from ascites, and the synthetic muIgG2a and muIgG2b variants.

25 Briefly, a NUNC MAXISORPTM plate was coated with two micrograms per ml of LT α (as described in Example 1 above) in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C, and then blocked with 0.5% BSA, 10 PPM PROCLINTM in PBS at room temperature for 1 hour. Serial dilutions of samples in PBS containing 0.5% BSA, 0.05% TWEENTM, 10 PPM PROCLINTM were incubated on the plates for 2 hours. After washing, bound antibody was
30 detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-human Fc (Jackson ImmunoResearch) using 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) as substrate. Absorbance was read at 450 nm. Both the IgG2a- and IgG2b-cloned variants bound similarly to the 3F12 antibody purified from ascites, indicating that the correct sequence had been synthesized.

35 3. Humanization of 3F12

Using the amino acid sequence of the chimeric clone, the CDR residues of the light and heavy chain were identified (Kabat). Oligonucleotide-directed mutagenesis was used to swap these CDRs onto vectors containing the coding sequences of the light and heavy chains of humanized anti-TGFβ 2G7 version 5 (WO 2005/97832), obtaining the CDRswap version of 3F12. The framework sequences thus derived are for the VL kappa subgroup I and VH subgroup III consensus sequences, respectively:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:51)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:55)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54) and
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46)-H1-WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:45)-H2-RATFSADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAD (SEQ ID NO:50)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49).

After expression and purification as described above, binding of the CDRswap to LTα was compared to that of the chimera. Binding for the CDR swap was almost completely lost.

To restore binding of the humanized antibody, mutations were constructed using DNA from the CDRswap as template. Using a computer-generated model, these mutations were designed to change human framework residues to their murine counterparts at positions where the change might affect CDR conformation of the antibody-antigen surface. Mutants and their relative binding by ELISA as described above are shown in Table 1 below.
Changing isoleucine 69 to phenylalanine, to give v2, increased binding significantly, as did the change Leu78Ala, while the change Asn73Lys gave no improvement over the CDRswap. Combining Ile69Phe and Leu78Ala gave version 5, which binds LTα approximately 5-fold less well than the chimera in this ELISA assay format.

Two variants were made to move the framework sequence closer to the human consensus. Version 6, with the changes Lys24Arg and Ser25Ala, was equivalent in binding to version 5. However, an attempt to change the usual aspartic acid at position 94 to the consensus arginine (version 7) resulted in almost complete loss of binding.

TABLE 1

3F12 variant	Heavy chain (VH) substitutions	Light chain (VL) substitutions	Relative binding*
Chimera			1
CDRswap	(CDR swap)	(CDR swap)	no binding
v2	I69F	(CDR swap)	>1000x down
v3	N73K	(CDR swap)	>1000x down
v4	L78A	(CDR swap)	>500x down

v5	I68F, L78A	(CDR swap)	5 to 20 fold down
v6	(CDR swap)	K24R, S25A	5 to 20 fold down
v7	D94R	(CDR swap)	no binding

5 *These values are relative to the original chimera (with heavy chain SEQ ID NO:35 and heavy-chain variable region set forth in Figure 1B), which was discovered later to have an “extra” serine in the FR3 of the heavy chain (a serine after the L at position c in SEQ ID NO:29 in Figure 3B). This serine was taken out to make chimera2 (having the heavy-chain variable region of SEQ ID NO:38 in Figure 1D), and the ELISA binding was found to be the same as above.

10 All animal studies described below using the 3F12 chimera refer to the original chimera, and not chimera2 as described in the footnote above.

4. Affinity maturation of antibody 3F12

15 For identification of which residues and regions in the CDRs might be most important for binding LT α , and thus candidates for inclusion in phage-display libraries for affinity maturation, partial alanine scanning was performed, using v5 as single-strand template for oligonucleotide-directed mutagenesis.

As shown in Table 2, several residues were found which when mutated to alanine produced a loss or gain in binding to LT α .

TABLE 2

version #	Position	relative binding*
	L1	
13	Y31A	3.40
14	T33A	0.72
15	N34A	0.49
16	K36A	3.70
17	F38A	0.32
	L3	
18	Q89A	4.20
19	Y91A	2.30
20	Y92A	0.71
21	S93A	0.82
22	Y94A	14.30
23	R96A	18.20
	H2	
24	G53A	34.10
25	G55A	1.20

26	S56A	1.07
27	N58A	1.70
28	Y59A	2.73
29	N60A	2.31
30	E61A	1.78
31	E62A	1.93
	H3	
8	G95A	>100
9	Y99A	10.00
10	H100A	>100
11	G101A	
12	Y102A	0.81

*The ratio of the EC50 of the variant divided by the EC50 of version 5 in plate-based ELISA against LT α . Higher numbers mean weaker binding, numbers >1 mean binding is less than that of version 5.

Thus, versions 14, 15, 17, 20, 21, and 12 have positions where changes could be made to improve binding affinity, and it is expected that conservative substitutions (or even non-conservative in some instances as determined by the skilled artisan by routine testing) could be made at those respective positions to increase binding.

EXAMPLE 3: Preparation of chimeric antibody 2C8 and humanization

1. Preparation of chimeric antibody

The variable regions of the heavy and light chains of the murine anti-LT α antibody 2C8 that bound and neutralized LT α 3 and LT α β were cloned and formatted as a murine/human chimeric antibody essentially as described above in Example 1 for the cloning of S5H3.

For RT-PCR, the primers used were as follows:

2C8 light chain:

5' primer: GCC ATA GAT ATC GTR ATG CAN CAG TCT C (SEQ ID NO:79)

3' primer: TTT KAT YTC CAG CTT GGT ACC (SEQ ID NO:80)

2C8 heavy chain:

5' primer: GAT CGA CGT ACG CTG AGG TYC AGC TSC AGC TSC AGC AGT CTG G (SEQ ID NO:81)

3' primer: ACA GAT GGG CCC TTG GTG GAG GCT GMR GAG ACD GTG ASH RDR GT (SEQ ID NO:82).

wherein K = G or T, S = C or G, D = A or G or T, M = A or C, H = A or C or T, N is T, G, A, or C (any nucleic acid of these four), R = A or G, and Y = C or T.

The variable domain of the light chain was cloned into vector pRK.LPG3.HumanKappa containing the human kappa constant domain, while the heavy-chain variable domain was cloned into expression vector pRK.LPG4.HumanHC encoding the full-length human IgG1 constant domains. These vectors are derivatives of previously described vectors for expression of IgGs in 293 cells (Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 276:6591-6604 (2000) and Gorman *et al.*, *DNA Prot Eng Tech*, 2:3-10 (1990)). For transient expression of antibody, these plasmids were co-transfected into 293 cells or CHO mammalian cell lines and the protein was purified as described in Example 1 above.

This chimeric antibody 2C8 was used in the animal experiments described below.

2. Humanization of 2C8

Humanization of the anti-LT α antibody 2C8 was carried out in a series of site-directed mutagenesis steps. Using the sequence of the variable domains of the chimera, the CDR residues of the light and heavy chains were identified by comparing the amino acid sequence of these domains with the sequences of known antibodies (Kabat *et al.*, *supra*). The CDRs were defined based on sequence hypervariability (Kabat *et al.*, *supra*) and are shown in Figure 2.

The CDR swap of 2C8 was made using oligonucleotide site-directed mutagenesis, wherein the CDR regions were put onto separate pRK5-based vectors for the light and heavy chains, respectively. These vectors contain the light-chain human kappa I constant domain, or for the heavy-chain vector, the human IgG1 constant domains CH1, hinge, CH2, and CH3 (Gorman, *Current Opinion in Biotechnology*, 1, (1), p36-47 (1990)).

Comparison to other humanized antibodies indicated that the light chain of 2C8 is very similar to the light chain of humanized anti-HER2 antibody 4D5 (US 5,821,337), while the heavy chain of 2C8 is similar in sequence to anti-TGF- β 2G7 (WO 2005/97832). Therefore, a vector containing the light chain of rhuMAb 4D5 was used as the template for the construction of the light chain of 2C8. Site-directed mutagenesis was performed on a deoxyuridine-containing template derived from this vector, using oligonucleotides with light-chain sequences shown in Table 3. Additionally, the oligonucleotide CA1730 was used to revert the framework 3 sequence to that of the human kappa I consensus.

TABLE 3
Oligonucleotides for 2C8 (light chain)

	<u>Substitution</u>	<u>Oligonucleotide sequence</u>
5	CDR-L1	CC TGG TTT CTG TTG ATA CCA GGC TAC AGC GGA AGA CAC AGC CTG ACT GGC ACG GCA GG (SEQ ID NO:83)
	CDR-L2	GCG AGA AGG GAC TCC AGT GTA ACG GTG GGA TGC AGA GTA AAT CTG TAG TTT CGG AGC (SEQ ID NO:84)
	CDR-L3	GGT ACC CTG TCC GAA CGT CCA AGG AGT AGA ATA ATG TTG CTG ACA GTA ATA AGT TGC (SEQ ID NO:85)
10	R66G (CA1730)	GGT CAG AGT GAA ATC CGT CCC AGA TCC GGA TCC AGA GAA GCG (SEQ ID NO:86)

(All the oligonucleotides were ordered as reverse complements to the coding strand, as the fl ori in pRK vectors is in the opposite orientation from that in pBR-based vectors.)

15 For the heavy chain, the deoxyuridine-containing template was derived from a vector containing the heavy chain of humanized antibody 2G7 (WO 2005/97832) using oligonucleotides shown in Table 4. The framework was converted to consensus using oligonucleotides KM55, KM56, and KM61.

TABLE 4
Oligonucleotides for 2C8 (heavy chain)

CDR-	GGC CTG ACG GAC CCA ATG GAT CAC ATA GCT GGT GAA TCT
H1	GTA GCC AGA AGC TGC (SEQ ID NO:87)
CDR-	CCC CTT GAA CTT CTC GTT ATA GTT GGT GCC GTC GTT ATA
H2	AGG ATT GTT ATA ACC AAC CCA CTC GAG GCC (SEQ ID NO:88)
	GGT TCC TTG ACC CCA GTA GGC GAA CCA TGG GAG CAT TGT
CDR-	GGG TCG AGA ACA ATA ATA GAC GGC AGT GTC CTC AGC (SEQ
H3	ID NO:89)
	CC GTC GTT ATA AGG ATT GTT ATA ACT AAC CCA CTC GAG
KM55	GCC (SEQ ID NO:90)
	CAT CTG CAG GTA TAG TGT GTT TTT CGA ATT GTC ACG ACT
KM56	GAT AGT GAA GCG CCC CTT GAA C (SEQ ID NO:91)
	CCA TGG GAG CAT TGT GGG TCG AGC ACA ATA ATA GAC GGC
KM61	AGT GTC C (SEQ ID NO:92)

25 The light and heavy chains comprising the CDR swap, v10, thus derived, were co-transfected into an adenovirus-transformed human embryonic kidney cell line, 293 (Graham *et al., supra*). Antibodies were purified from culture supernatants using protein A-

SEPHAROSE CL-4BTM resin, then buffer-exchanged into 10 mM sodium succinate, 140 mM NaCl, pH 6.0, and concentrated using a CENTRICON-10TM concentrator (Amicon).

For measuring relative binding affinities of the CDR swap, and subsequent 2C8 variants, to human LT α , a plate-based ELISA was used as described above.

As shown in Table 5, the CDR swap, v10, shows no binding in the LT α ELISA. Version 2 and subsequent versions were constructed to regain this binding. Version 2 regains binding equivalent to the chimera, but contains seven non-consensus residues. Further variants were studied to obtain a framework as close to consensus as possible while still retaining or improving binding relative to the chimera. Version 12 has binding equivalent to (by ELISA), or slightly better than (by BIACORETM analysis), the chimera, and retains only five non-consensus residues. The light- and heavy-chain sequences of versions 7 and 12 are provided in Figure 2C.

TABLE 5

2C8 version	HC	LC	ELISA IC ₅₀ ratio	BIACORE TM (rhLT α)		mutations
				KD	ka/kd	
v0	v0	v0	1	0.6nM		
v2	v2	v1	1.7	0.2nM	6e5/ 1e-4	
v3	v3	v1	10.2			
v4	v4	v1	27.8			
v7	v2	v2	1.2	0.4nM	5e5/ 1.6e-4	LC.Q46L
v8	v8	v1	non- binding			HC.G49S.S93A
v10	v10	v1	non- binding			CDRswap
v12	v12	v2	1	0.07nM	2e6/ 0.9e-4	HC.A67F
v13	v13	v2	2.4			HC.S71R
v14	v14	v2	2			HC.K73N
v15	v15	v2	11.1			HC.A93S
v16	v12	v3	0.6			LC.Q46L.E89Q.S90H
vX	vX	v3	0.3			HC.D53A.A67F

3. Affinity maturation of 2C8

A humanized 2C8 monoclonal antibody with improved affinity to LT α was selected from a library of monovalent Fab displayed on phage. A template was generated that displays the humanized 2C8.v2 Fab and contains a stop codon in the CDR-L3.

Oligonucleotides (listed in Table 6) were designed to soft- randomize specific CDR-L3 and CDR-H3 residues.

TABLE 6

Soft randomization oligonucleotides for affinity maturation of 2C8 CDR-L3 and CDR-H3

Oligonucleotide name	Sequence ¹
KM73.2C8.phage.v3.LC3.soft	GGA AGA CTT CGC AAC TTA TTA CTG TCA G75 575 885 887 857 8CC T86 6AC GTT CGG ACA GGG TAC CAA GGT GG (SEQ ID NO:93)
KM74.2C8.phage.v3.HC3.soft	G GAC ACT GCC GTC TAT TAT TGT TCT CGA CCC 575 576 787 CCA 866 887 677 TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTG G (SEQ ID NO:94)

¹ Soft randomization code (A=5, G= 6, C= 7 and T= 8): each degenerate base is 70% wild-type with 10% equimolar amounts of the remaining three nucleotides added.

5 Three rounds of sorting on LTα were used to selectively capture high-affinity Fab molecules with less than 2 nM binding to the antigen. For the first round, phage were captured for 2 hours against 2 μg/ml plate-coated LTα at ambient temperature. The second and third rounds of selection were performed at ambient temperature by capturing phage for 30 minutes with 2 nM biotinylated LTα in solution phase, followed by capture on

10 neutravidin-coated plates. The highest affinity clone was identified using a competitive ELISA. Constant concentrations of phage clones (normalized by solid-phase LTα binding OD) were incubated with increasing concentrations of LTα (0-50 nM) in solution before capture on a plate coated with 2 μg/ml LTα. One clone demonstrated a 10-fold improvement in competition with LTα over wild-type 2C8.v2. DNA sequencing of this phagemid clone

15 revealed two amino acid changes from the wild-type 2C8 sequence in CDR-L3: glutamine at position 89 was changed to a glutamic acid, and histidine at position 90 was changed to a serine. These two CDR-L3 changes were made by site-directed mutagenesis on the wild-type 2C8.v7 light chain. When v7 light chain was transfected into 293 cells with the 2C8.v12 heavy chain to give 2C8.v16, the resultant antibody demonstrated a two-fold improvement in

20 IgG binding to LTα by ELISA when compared to 2C8.v2 (Table 5).

 To enhance stability, by removing a potential aspartic acid isomerization site, asp 53 in heavy-chain CDR2 was changed to alanine. The resultant 2C8 variant, vX, had a 3.5-fold and 3-fold improvement in binding to LTα by ELISA, compared to the 2C8.v2 and 2C8.chimera, respectively (Table 5).

25 Table 7 below shows how residue changes in CDR-L3 regions ranked as to ability to bind LTα by ELISA analysis.

TABLE 7

Affinity maturation of 2C8 by phage display: sequence changes in phagemid CDR-L3 regions ranked by ability to compete rhLTα

Phagemid clone	CDR-L3 Sequence ^{1,2}	rhLTα Competitive ELISA IC ₅₀ (nM)
Wild-type	QQHYSTPWT (SEQ ID NO:9)	3.14
A8	QESYSTPWT (SEQ ID NO:10)	0.32
G7	QENYSTPWT (SEQ ID NO:11)	0.57
H6	QEVYSTPWT (SEQ ID NO:12)	1.1
C12	QEHYSTPWT (SEQ ID NO:95)	3.41
H9	QQHYYPWT (SEQ ID NO:96)	3.80
G2	QQYYSTPWT (SEQ ID NO:97)	4.51
G12	QKTFSTPWT (SEQ ID NO:98)	5.34
D8	QQFYSPWT (SEQ ID NO:99)	136.62
E2	QQKYSTPWT (SEQ ID NO:100)	not determined ³

¹ Boldface and italicized type shows residues randomized.
² All phagemids retained the wild-type CDR-H3 sequence
³ Clone E2 did not meet rhLTα direct ELISA binding threshold (of OD= 1) necessary for phagemid normalization in competitive ELISA.

It can be seen from this table that the best clones were A8, G7, and H6, which all bound rhLTα with higher affinity than the wild-type clone.

EXAMPLE 4: Anti-LTα antibody inhibits antibody-induced arthritis (AIA)

AIA differs from collagen-induced arthritis (CIA), described below, in that instead of injecting the antigen (bovine collagen type II), antibodies recognizing type II collagen are injected. In this way, adaptive B- and T-cell responses are circumvented to directly induce effector functions on macrophages and neutrophils through Fc receptor and complement-mediated activation.

AIA was induced in mice by i.v. injection of a combination of four different monoclonal antibodies generated by the ARTHROGEN-CIA™ mouse B-hybridoma cell lines. Three of the monoclonal antibodies recognize autoantigenic epitopes clustered within an 84-amino-acid residue fragment, LyC2 (the smallest arthritogenic fragment of type II collagen) of CB11, and the fourth monoclonal antibody reacts with LyC1. All four

antibodies recognize the conserved epitopes shared by various species of type II collagen and crossreact with homologous and heterologous type II collagen.

All groups (n=5/group) received 2 mg of a cocktail of monoclonal antibodies i.v. in 100 µl PBS on day 0 followed by 25 µg LPS i.p. in 50 µl PBS on day 3. Animals were
5 treated on Day -1 (preventive) or Day 4 (therapeutic) with 10 mg/kg control isotype (anti-ragweed), hamster-murine chimeric LT α antibody S5H3 (as a surrogate for the anti-human LT α antibodies), anti-LT.Fc mutant (an anti-LT α antibody with DANA mutations in the Fc region as described below), or TNFRII.Fc (a TNFR.Ig immunoadhesin) intraperitoneally or subcutaneously. Swelling of the paws was monitored for 14 days. Each paw was given a
10 score of 0-4, for a total maximum of 16 per animal.

DANA mutations in the anti-LT.Fc mutant used in this Example and others below refer to two single-position changes in the Fc region of mouse or human IgG. These changes are D (Aspartic Acid) to A (Alanine) in position 265 and N (Asparagine) to A (Alanine) in position 297. The DANA mutant was constructed by introducing alanine residues into
15 positions 265 and 297 of mouse or human IgG by a PCR-based site-directed mutagenesis method (GENE TAILOR™, Invitrogen Corp.).

Figure 4A shows the average clinical score for the prophylactic treatment of each group described above as a function of days post-induction. It can be seen that the S5H3 antibody was the most effective in this model of all the treatment groups, including the
20 TNFRII.Fc and anti-LT.Fc mutant molecules. Thus, antibody S5H3 significantly inhibited the development of arthritis in this antibody-induced model. Anti-LT α with the Fc DANA mutation (anti-LT.Fc mutant) had no efficacy, indicating that Fc-mediated killing of LT α -expressing cells was required for efficacy (Figure 4A).

Figure 4B shows the average clinical score for therapeutic treatment of each group
25 described above as a function of days post-induction. The results show that the S5H3 antibody significantly inhibited the development of arthritis in this antibody-induced model when administered therapeutically, versus the other molecules tested.

In conclusion, animals treated with the hamster-mouse chimera S5H3 had significantly reduced clinical scores as compared to animals treated with S5H3.DANA or
30 control. S5H3 demonstrated both prophylactic and therapeutic efficacy in this animal model.

EXAMPLE 5: Anti-LT α inhibits collagen-induced arthritis (CIA)

In RA the synovial membrane of multiple joints can become inflamed, leading to destruction of joint tissues including bone and cartilage. The synovium of RA can be highly inflammatory in nature and is typically characterized by lymphocyte and mononuclear cell infiltration, T-cell and antigen-presenting cell (APC) activation, B-cell immunoglobulin (Ig) secretion, and pro-inflammatory cytokine production (Potocnik *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 31:213 (1990); Wernick *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 28:742 (1985); Ridley *et al.*, *Br. J. Rheumatology*, 29:84 (1990); Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 152:2613 (1994); and Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 156:3074 (1996)). Chronically inflamed synovium is usually accompanied by a massive CD4 T- cell infiltration (Pitzalis *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 18:1397 (1988) and Morimoto *et al.*, *Am. J. Med.*, 84:817 (1988)).

Collagen-induced arthritis (CIA) is an animal model for human RA, which resembles human disease, and can be induced in susceptible strains of mice by immunization with heterologous type-II collagen (CII) (Courtenay *et al.*, *Nature*, 283:665 (1980) and Cathcart *et al.*, *Lab. Invest.*, 54:26 (1986)). Both CD4 T cells and antibodies to CII are required to develop CIA. Transfer of anti-CII to naïve animals only leads to partial histo-pathology that is quite different from CIA, and complete symptoms of CIA do not develop (Holmdahl *et al.*, *Agents Action*, 19:295 (1986)). In contrast, adoptive transfer of both CD4 T cells and anti-CII antibodies from CII-immunized mice to naïve recipients completely reconstitutes the symptoms of classical CIA (Seki *et al.*, *J. Immunol.*, 148:3093 (1992)). Involvement of both T cells and antibodies in CIA is also consistent with histo-pathological findings of inflamed joints in CIA. Thus, agents that block B- cell or T-cell functions, or inhibit pro-inflammatory cytokines induced by T cells, may be efficacious to prevent or treat arthritis. Indeed, depletion of CD4 T cells, blockade of CD40-CD40L interactions, neutralization of TNF- α , or blocking of IL-1 receptors can lead to prevention of CIA in mice (Maini *et al.*, *Immunol. Rev.*, 144:195 (1995); Joosten *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 39:797 (1996); and Durie *et al.*, *Science*, 261:1328 (1993)).

In the CIA model used herein, DBA-1J mice were immunized with 100 μ g bovine collagen type II in 100 μ l of Complete Freund's Adjuvant (CFA) on Day 0 and Day 21 intradermally. At Day 24 post- immunization, mice were randomly divided into treatment groups. Animals were subcutaneously treated either with 6 mg/kg in 100 μ l anti-ragweed IgG2a monoclonal antibody (control antibody) or with hamster-mouse chimeric anti-LT α antibody (S5H3), anti-LT α .Fc mutant, or murine TNFRII-Ig at 4 mg/kg in 100 PBS.

Animals were treated three times weekly for the duration of the study. Limbs of animals were examined daily for signs of joint infiltration using a grading system of 1-4 for each joint, giving a maximum score of 16.

In a CIA-preventative model, the use of hamster-murine anti-LT α antibody S5H3 and TNFRIL.Fc reduced the average clinical score over the period of days up through 70 days versus the anti- S5H3.DANA Fc mutant and isotype control (anti-ragweed IgG2a monoclonal antibody). See Figure 5A, showing comparable efficacy in the CIA preventative murine model of the antibody S5H3 with TNFR.Ig.

Figure 5B shows comparable efficacy of the hamster-murine chimeric anti-LT α antibodies (S5H3) with TNFRIL.Fc over 90 days in this therapeutic CIA murine model, which efficacy is far better than the isotype control in reducing average clinical score. These results along with those in Figure 5A show that the antibodies herein are considered useful in preventing and being efficacious in autoimmune diseases such as RA. It is expected that the anti-LT α antibodies herein would be effective in preventing and treating RA in those who are non-responsive to TNF therapies in general, including TNFR.Ig and anti-TNF α antibodies, so that such non-responders could be treated with such antibodies prophylactically and efficaciously.

EXAMPLE 6: Anti-LT α delays onset and severity of encephalomyelitis (EAE) disease in MBP-TCR transgenic mice

Experimental autoimmune/allergic encephalomyelitis (EAE) is an inflammatory condition of the central nervous system with similarities to MS. In both diseases, circulating leukocytes penetrate the blood-brain barrier and damage myelin, resulting in impaired nerve conduction and paralysis. The EAE murine model (transgenic mouse preventative model) has been described as a model for human MS (Grewal *et al.*, *Science*, 273:1864-1867 (1996)).

MBP_{Ac1-11} T-cell receptor transgenic mice (10-to-15 week-old male and female adult MBP-TCR transgenic mice bred from an animal breeding pair obtained from Dr. Richard Flavell, Howard Hughes Medical Institute, Yale University) were immunized with 10 μ g of MBP_{Ac1-11} in 100 μ l of CFA subcutaneously. On Days 1 and 2 all mice were additionally injected intraperitoneally with pertussis toxin at 200 ng/100 μ l/mouse. On Day 0, mice (n=10/group) received either anti-gp120 IgG1 monoclonal antibody (control antibody) or hamster-mouse chimera anti-LT α antibody S5H3 at 6 mg/kg in 100 μ l i.p. and then 6 mg/kg in 100 μ l PBS s.c. three times weekly.

Animals were evaluated daily for clinical signs using the following grading system: 0 - Normal mouse; no overt signs of disease; 1- Limp-tail or hind-limb weakness, but not both; 2- Limp-tail and hind- limb weakness; 3- Partial hind-limb paralysis; 4- Complete hind-limb paralysis; 5- Moribund.

5 The results are shown in Figure 6. The disease score was lower for the anti-LT α -treated mice than for the control group, only reaching clinical scores of 3 (versus clinical scores of over 4 for the control) during the study. The results show that the antibody S5H3 delayed onset and severity of EAE disease in these transgenic mice, suggesting that the antibody treatment protected the mice from developing overt EAE.

10 **EXAMPLE 7: Anti-LT α antibody treatment does not affect T-cell-dependent antibody isotype responses, indicating safety**

The immune response to i.v.-injected trinitrophenol (TNP)-FICOLLTM is very high in 15 most mouse strains, allowing one to assay the relative safety of an antibody administered to such mice by measuring various isotype levels in the mice.

BALB/c mice (n=12/group) were treated on Day 0 with either anti-ragweed isotype control, hamster-mouse anti-LT α antibody (S5H3), anti-LT.Fc mutant, or CTLA4-Fc (as a positive control) at 6 mg/kg in 100 μ l PBS intra-peritoneally. Treatment continued three 20 times per week for 5 weeks. Mice were immunized on Day 1 with TNP-OVA (100 μ g) in 2 mg of alum per mouse intra-peritoneally, and on Day 29 with TNP-OVA (50 μ g) in PBS per mouse intra-peritoneally. Serum was collected on Days 0, 14, and 35 for determination of the anti-TNP Ig isotypes IgM, IgG1, and IgG2a by standard ELISA.

The results, shown in Figures 7A-7C, wherein the data are represented as Log10 titers 25 of anti-TNP IgM, IgG1, and IgG2a, respectively, indicate that the isotype control, S5H3 antibody, and DANA Fc mutant antibody exhibited similar patterns for each of the isotype levels, whereas the CTLA4.Fc immunoadhesin acted differently. This indicates that there would be little, if any, immune response in a patient to the administration of the S5H3 antibody herein.

30 **EXAMPLE 8: Anti-LT α antibody treatment does not affect T-cell-independent antibody isotype responses, indicating safety**

BALB/c mice (n=10/group) were treated on Day 0 with either anti-ragweed (IgG2a 35 isotype control), hamster-mouse anti-LT α antibody (S5H3), or TNFRIL.Fc at 6 mg/kg in 100 μ l PBS intra-peritoneally. Treatment continued three times per week for 10 days. Mice were

immunized on Day 1 with TNP-FICOLL™ (100 µg) i.p. in 100 µl PBS intra-peritoneally. Serum was collected on Days 0 and 10 for determination of the anti-TNP Ig isotypes IgM, IgG1, IgG2a, and IgG3 by standard ELISA.

Figure 8, wherein the data are represented as Log10 titers, shows that the isotype control, the S2C8 antibody, and the TNFR1I.Fc immunoadhesin all behaved similarly for the IgM, IgG1, IgG2a, and IgG3 isotypes. This demonstrates further the safety of the antibodies herein for administration *in vivo*.

EXAMPLE 9: Anti-LTα antibody prevents human SCID graft-versus-host disease (GVHD)

Graft-versus-host disease (GVHD) occurs when immunocompetent cells are transplanted into immunosuppressed or tolerant patients. The donor T cells recognize host antigens and become activated, secrete cytokines, proliferate, and differentiate into effector cells. This response is known as graft-versus-host-reaction (GVHR). The GVHR response is a multi-organ syndrome, and the effects can vary from life-threatening severe inflammation to mild cases of diarrhea and weight loss. GVHD models in mice have been used to model the clinical disorders of acute and chronic GVHR that occur after bone-marrow transplantation and autoimmune diseases. A general procedure is described in *Current Protocols in Immunology, supra*, unit 4.3.

SCID mice were reconstituted with human PBMCs purified from a LEUKOPACK™ (available from blood banks such as Interstate Blood Bank, Memphis, TN) of a normal donor by FICOLL™ polysaccharide gradient. All mice (n=10/group) were sub-lethally irradiated with 350 rads using a Cesium 137 source. Two hours after irradiation, mice were injected with 50 million human PBMCs/mouse in 200 µl PBS intravenously. Immediately after cell injection, mice were treated i.p. either with 300 µg of trastuzumab (human IgG1 isotype control antibody), anti-LTα chimeric antibody 2C8, or CTLA4-Fc in 100 µl saline two times/week for three weeks. POLYMYXIN™ B (110 mg/liter) and NEOMYCIN™ (1.1 g/liter) antibiotics were added to the drinking water for five days post-irradiation. Mice were monitored for GVHD as indicated by survival.

The results are shown in Figure 9, and indicate that as compared to the isotype control, the 2C8 antibody significantly increased survival of the human SCID mice (preventing GVHD), as compared to anti-LTα 2C8 Fc mutant and the isotype control, with the CTLA4.Fc immunoadhesin being the best in this model of the molecules tested. Thus, the anti-LTα antibodies herein are expected to be useful in the prevention and/or treatment of

graft-versus-host disease. Further, the results show that depletion of LT α -positive cells is required for efficacy in this model, since the 2C8 Fc mutant (DANA) did not show efficacy.

EXAMPLE 10: Anti-LT α monoclonal antibodies bind to LT α 3

5 Microtiter wells were coated with 1 μ g/ml human LT α 3 in 50 mM carbonate buffer solution (100 μ l/well) overnight. The unabsorbed solution was decanted from the wells. Wells were blocked with 150 μ L PBS containing 5 mg/ml bovine serum albumin (PBS-BSA) for 1-2 hour. 100 μ L of appropriately diluted test sample (anti-LT α chimeric antibody 2C8 or 3F12) diluted in PBS-BSA was added to each well, incubated for one hour, and washed
10 with PBS containing 0.05% TWEENTM-20 surfactant. 100 μ L of biotin-labeled rat anti-mouse IgG in PBS-BSA buffer was then added to each well and incubated for one hour. The plate was then washed with PBS/0.05%TWEENTM-20 surfactant, and streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) was added for 30 minutes to each well. Each well was washed with PBS/0.05%TWEENTM-20 surfactant, and bound HRP was measured with a
15 solution of tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂. After 15 minutes, the reaction was quenched by the addition of 100 μ l of 1M phosphoric acid. The absorbance at 450 nm was read with a reference wavelength of 650 nm.

FIG. 10A shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 bound to human LT α 3.

20 The above procedure was repeated using murine LT α 3 instead of human LT α 3 and hamster-mouse chimeric anti-LT α antibody S5H3 and anti-LT.Fc mutant as the antibody tested for binding ability. FIG. 10B shows that both S5H3 and the anti-LT α .Fc mutant bound to murine LT α 3.

25 EXAMPLE 11: Anti-LT α antibodies bind to LT α 1 β 2

For the LT α β ELISA, microtiter wells were coated with 1 μ g/ml murine LT α 1 β 2 in 50 mM carbonate buffer solution (100 μ l/well) overnight. The unabsorbed solution was decanted from the wells. Wells were blocked with 150 μ L PBS containing 5 mg/ml bovine serum albumin (PBS-BSA) for 1-2 hours. 100 μ L of an appropriately diluted test sample
30 (anti-LT α chimeric antibody S5H3 or anti-LT α .Fc mutant diluted in PBS-BSA) was added to each well, incubated for one hour, and washed with PBS containing 0.05% TWEENTM 20 surfactant. 100 μ L of biotin-labeled rat anti-mouse IgG in PBS-BSA buffer was then added to each well and incubated for one hour. The plate was then washed with PBS/0.05%
35 TWEENTM 20 surfactant, and streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) was added for

30 minutes to each well. Each well was washed with PBS/0.05% TWEENTM 20 surfactant, and bound HRP was measured with a solution of tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂. After 15 minutes, the reaction was quenched by the addition of 100 µl of 1M phosphoric acid. The absorbance at 450 nm was read with a reference wavelength of 650 nm.

5 FIG. 11A shows that anti-LTα chimeric antibody S5H3 bound to the murine LTα1β2 complex, as did the anti-LT.Fc mutant.

A FACS assay was used to determine binding of anti-LTα antibody to the LTα on the surface of cells complexed with LTβ. For human LTαβ, 293 cells were transfected with full-length human LTα and human LTαβ (human LTα sequence GenBank Ref NM_000595; human LTβ sequence GenBank Ref NM_002341) to generate stable human LTαβ-
10 expressing cell lines. Cells were incubated with 1-5 µg/ml of anti-LTα chimeric antibody 3F12 or 2C8, human LTβR.huIgG1, or huIgG1 isotype control (trastuzumab) for 20 minutes in PBS with 2% FBS. Cells were washed and incubated with anti-human Ig-PE secondary antibodies for detection.

15 For murine LTαβ, SVT2 cells were transfected with full-length murine LTα and murine LTαβ (murine LTα sequence GenBank Ref NM_010735; murine LTβ sequence GenBank Ref NM_008518) to generate stable murine LTαβ-expressing cell lines. Surface LT was detected with hamster-murine chimera S5H3, anti-LT.S5H3.Fc mutant, muLTβR.IgG2a, or isotype control (anti-IL122 muIgG2a) directly conjugated to ALEXA-
20 647TM fluorophore, for 20 minutes in PBS with 2% FBS. Cells were washed, aspirated, and resuspended in PBS with 2% FBS. Cells were analyzed on a FACSCALIBURTM (dual laser) using CELLQUESTTM software, and results analyzed on a FLOWJOTM analyzer (Treestar).

FIG. 11B shows how well the chimeric anti-LTα antibodies 3F12 and 2C8 bound to the LTα on the surface of human cells complexed with LTβ. They are compared to LTβ-receptor.huIgG1 and isotype control huIgG1 (trastuzumab). All human antibodies bound
25 surface LTα.

FIG. 11C shows how well hamster-murine anti-LTα antibody S5H3 bound to the LTα on the surface of murine cells complexed with LTβ. It is compared to LTβ-receptor murine IgG2a, anti-LT S5H3 Fc mutant, and isotype control (anti-IL122 muIgG2a). All murine
30 antibodies bound surface LTα.

EXAMPLE 12: Anti-LT α antibodies bind to human Th1, Th2, and Th17 cells

When CD4+ T cells mature from thymus and enter into the peripheral lymph system, they usually maintain their naive phenotype before encountering antigens specific for their T cell receptor (Sprent *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 20:551-79 (2002)). The binding to specific antigens presented by APC, causes T cell activation. Depending on the environment and cytokine stimulation, CD4+ T cells differentiate into a Th1 or Th2 phenotype and become effector or memory cells(Sprent *et al.*, *supra* and Murphy *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 2(12):933-44 (2000)). This process is known as primary activation. Having undergone primary activation, CD4+ T cells become effector or memory cells, they maintain their phenotype as Th1 or Th2. Once these cells encounter antigen again, they undergo secondary activation, but this time the response to antigen will be quicker than the primary activation and results in the production of effector cytokines as determined by the primary activation (Sprent *et al.*, *supra*, and Murphy *et al.*, *supra*).

For primary activation conditions, naïve T cells were activated by anti-CD3, anti-CD28, and specific cytokines depending on whether Th1 or Th2 was being examined. In particular, human Th1 and Th2 cell lines were generated by stimulating human PBMC with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 (10 μ g/ml and 5 μ g/ml, respectively; BD PharMingen). On Day 1, to induce Th2 differentiation, interleukin (IL)-4 (5 ng/ml; R&D Systems Inc.), anti-IL-12 (5 μ g/ml; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), and anti-interferon (IFN)-gamma (5 μ g/ml; R&D Systems Inc.) were added. For Th1 differentiation, on Day 1 IL-12 (1 ng/ml; R&D Systems Inc.), IFN-gamma (10 ng/ml; R&D Systems Inc.), and anti-IL-4 (1 μ g/ml; R&D Systems Inc.) were added. Cells were restimulated twice at Days 7 and 14.

For FACS analysis cell-surface staining to determine binding of the antibodies to Th1 and Th2, two days after final stimulation, the activated human T-cells (Th1/Th2 cell lines) were incubated with anti-LT α antibody 2C8 (1 μ g/ml), 3F12 (1 μ g/ml), LT β R.Fc (1 μ g/ml), TNFR1I.Fc (1 μ g/ml) or huIgG1 isotype control (1 μ g/ml), all directly conjugated to ALEXA FLUOR® 647 fluorophore (Invitrogen Corp.), for 20 minutes in PBS with 2% FBS. Cells were washed, aspirated, and re-suspended in PBS with 2% FBS. Cells were analyzed on a FACSCALIBUR™ (dual laser) using CELLQUEST™ software, and results analyzed on a FLOWJO™ analyzer (Treestar).

FIG. 12A and 12B show that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 bound to human Th1 and Th2 cells, respectively. The graphs also show the binding results for LT β R.Fc, TNFRII.Fc, and isotype control.

Since LT- α 3 and LT- α 1 β 2 were found to be expressed on human Th17 cells as well as human Th1 cells via FACS analysis, it would be expected that the anti-LT α antibodies herein, including chimeric 2C8, 2C8.v2, and 2C8.vX (described in Examples 3 and 18), would (similarly to Th1 and Th2) bind to human Th17 cells and hence be useful in treating many autoimmune diseases, including MS (they drive EAE in murine models) and lupus as well as RA and IBD, such as Crohn's disease and ulcerative colitis.

Hence, the same experiment described above was performed, except for using anti-LT α humanized antibody 2C8.vX as the LT α antibody and using a Th17 cell line as well as the Th1 cell line, but not a Th2 cell line. The human Th17 cell lines were generated by stimulating human PBMC with anti-CD3 and anti-CD28 as noted above and with IL-23 (10 ng/ml; R&D Systems Inc.), anti-IFN- γ (10 μ g/ml; R&D Systems Inc.), and anti-IL-12 (10 μ g/ml; R&D Systems Inc.). This experiment showed that, in fact, antibody 2C8.vX bound to human Th17 cells as well as human Th1 cells, but not to resting cells. See FIG. 12C-E.

EXAMPLE 13: Anti-LT α antibodies bind to human cells: T, B and NK A

A FACS assay was used to determine binding of anti-LT α antibodies to the LT α on the surface of primary human cells. Human PBMC were isolated and activated with anti-CD3 and anti-CD28 (10 μ g/ml and 5 μ g/ml, respectively; BD PharMingen) for two days for activated CD4 and CD8 cells; or anti-IgM (10 μ g/ml, R&D Systems Inc.) and IL-4 (20 ng/ml; R&D Systems Inc.) for two days for B cells. NK CD56+ cells were isolated by negative selection (Miltenyi Biotec) and incubated with IL-15 (20 ng/ml; R&D Systems Inc.) for 15 hours.

For FACS analysis, cells were incubated with chimeric anti-LT α antibody 3F12 (1 μ g/ml), human LT β R.huIgG1 (1 μ g/ml), or huIgG1 isotype control (trastuzumab, 1 μ g/ml), all directly conjugated to ALEXA FLUOR® 647 fluorophore (Invitrogen Corp.), for 20 minutes in PBS with 2% FBS. Cells were washed, aspirated, and re-suspended in PBS with 2% FBS. Cells were analyzed on a FACSCALIBUR™ (dual laser) using CELLQUEST™ software, and results analyzed on a FLOWJO™ analyzer (Treestar).

Figures 13A-13E show that the antibodies bound to the cells, versus the isotype control. Fig. 13A represents the unactivated cells, Fig. 13B shows the anti-CD3 and anti-CD28-activated CD4 T cells, Fig. 13C shows the CD8 T cells, Fig. 13D shows the IL15-activated CD56 NK cells, and Fig. 13E shows the IgM and CD40L-activated CD19 B cells.

5

EXAMPLE 14: Anti-LT α monoclonal antibodies functionally block LT α 3

1. Blocking of human and murine LT α 3

Microtiter wells were coated with 0.7 μ g/ml human TNFRII.huIgG1 (ENBREL®) in 50 mM carbonate buffer solution (100 μ l/well) overnight. The unabsorbed solution was aspirated from the wells. Biotinylated LT α 3 (murine or human) was captured and detected with streptavidin-horse radish peroxidase (HRP). For neutralization of human LT α 3, increasing doses of chimeric anti-LT α antibodies 2C8 or 3F12 or control isotype (trastuzumab) were preincubated with the LT α 3 at indicated concentrations for one hour before adding to the coated microplate. The same procedure was carried out for neutralization of murine LT α 3 using the hamster-mouse chimeric anti-LT α antibody S5H3 or anti-LT.Fc mutant or control isotype (trastuzumab). Each well was washed with PBS/0.05%TWEEN™ 20 surfactant, and bound HRP was measured with a solution of tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂. After 15 minutes, the reaction was quenched by the addition of 100 μ l of 1M phosphoric acid to each well. The absorbance at 450 nm was read with a reference wavelength of 650 nm.

FIG. 14A shows that anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 functionally blocked human LT α 3 versus the isotype control. FIG. 14B shows that anti-LT α antibody S5H3 and the anti-LT.Fc mutant functionally blocked murine LT α 3 versus the isotype control.

2. Blocking of LT α 3-induced IL-8 in A549 cells

Epithelial cell lines (A549) were cultured in the presence of LT α 3 for 24 hours. Neutralization of the effect of LT α 3 with chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 was determined by serial dilutions of the anti-LT α antibodies (10-0 μ g/ml) added to the appropriate wells. Supernatant was used to detect IL-8 in a standard ELISA.

FIG. 14C shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 blocked LT α 3-induced IL-8 in A549 cells versus the isotype control (trastuzumab IgG1).

3. Blocking of LT α 3-induced ICAM expression on HUVEC

HUVEC cells were cultured in the presence of LT α 3 for 24 hours. Neutralization of the effect of LT α 3 with chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 was determined by serial

dilutions of the anti-LT α antibodies (10-0 μ g/ml) added to the appropriate wells. Cell-surface expression of ICAM-1 was determined by FACS, shown as mean fluorescent intensity. TNFRII.Fc was used as a control.

FIG. 14D shows that anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12, as well as the TNFRII.Fc mutant, blocked LT α 3-induced ICAM expression on HUVEC versus the isotype control (trastuzumab IgG1). The effect on unstimulated cells is also shown.

4. Blocking of LT α 3-induced NF κ B activation

To determine if anti-LT α antibodies block signaling of LT α 3 through the TNF receptors, 293 cell-lines were cultured in DMEM:F12 50:50 (+ 10% FBS, glutamine, P/S) to 75% confluency. Cells were transfected with a standard NF κ B-RE-luciferase reporter construct using standard transfection techniques (Fugene). After 24 hours, the cells were washed, and then stimulated with LT α 3 (100 ng/ml) or with serial dilutions of the chimeric anti-LT α antibody 2C8 (10-0 μ g/ml) that were preincubated with LT α 3 for 30 minutes. After six hours, the cells were washed with PBS, and luciferase activity was measured as follows: LYSIS BUFFERTM (Promega, 125 μ l/well) was added for 15 minutes. Lysates were collected and transferred at 20 μ l/well to a 96-well assay plate (high-binding, white polystyrene, COSTARTM) in triplicates and read in a LMAXIITM plate reader (Molecular Devices) after injection of LUCIFERASE ASSAY REAGENTTM and STOP AND GLO BUFFERSTM (Promega). The isotype control used was trastuzumab IgG1.

FIG. 14E shows that the anti-LT α antibody 2C8 blocked LT α 3-induced NF κ B activation, versus the isotype control. The effect on unstimulated cells is also shown.

EXAMPLE 15: Anti-LT α antibodies functionally block LT α 1 β 2

1. Blocking of LT α -induced NF κ B activation

To determine if anti-LT α antibody blocks signaling of LT α 1 β 2 through the LT β R, 293 cell lines were cultured in DMEM:F12 50:50 (+ 10% FBS, glutamine, P/S) to 75% confluency. Cells were transfected with standard NF κ B-RE-luciferase reporter construct using standard transfection techniques (Fugene). After 24 hours, the cells were washed, and then stimulated with LT α 1 β 2 (R&D Systems Inc.; 100 ng/ml) or with serial dilutions of the chimeric anti-LT α antibody 2C8 (10-0 μ g/ml) that were preincubated with LT α 1 β 2 for 30 minutes. After six hours, the cells were washed with PBS, and luciferase activity was measured as follows: LYSIS BUFFERTM (Promega, 125 μ l/well) was added for 15 minutes. Lysates were collected and transferred at 20 μ l/well to a 96-well assay plate (high-binding,

white polystyrene, COSTAR™) in triplicates and read in a LMAXII™ plate reader (Molecular Devices) after injection of LUCIFERASE ASSAY REAGENT™ and STOP AND GLO BUFFERS™ (Promega). The isotype control used was trastuzumab IgG1.

FIG.15A shows that anti-LT α antibody 2C8 functionally blocked LT α 1 β 2-induced NF κ B activation, versus the isotype control. The response of unstimulated cells is also shown.

2. Blocking of LT α 3-, LT α 2 β 1-, and LT α 1 β 2-induced cytotoxicity

Test samples were assayed for ability to neutralize the cytolytic activity of LT α 3, LT α 2 β 1, and LT α 1 β 2 (R&D Systems Inc.) in a murine L929 cytotoxic assay. L929 cells were cultured in microtiter plates in the presence of one of the three LT α reagents (at the doses indicated in Figs. 15B-D) and the DNA inhibitor actinomycin-D. Neutralizing chimeric anti-LT α antibody 2C8 was added to the cultures at 10 μ g/ml. Cell lysis was determined by standard ALAMARBLUE™ stain of viable cells and represented as relative fluorescence units (RFU).

FIG. 15B, 15C, and 15D show that chimeric anti-LT α antibody 2C8 blocked, respectively, LT α 3-, LT α 2 β 1-, and LT α 1 β 2-induced cytotoxicity.

3. Blocking of LT α 1 β 2-induced ICAM expression on HUVEC

HUVEC cells were cultured in the presence of LT α 1 β 2 (R&D Systems Inc.) for 24 hours. Neutralization of the effect of LT α 1 β 2 with anti-LT α antibodies was determined by serial dilutions of chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 (10-0 μ g/ml) added to the appropriate wells. Cell-surface expression of ICAM-1 was determined by FACS.

FIG. 15E shows that chimeric anti-LT α antibodies 2C8 and 3F12 blocked LT α 1 β 2-induced ICAM expression on HUVEC, versus the isotype control (trastuzumab IgG1). The effect on unstimulated cells is also shown.

EXAMPLE 16: Anti-LT α monoclonal antibody can kill LT α β -expressing cells.

An ADCC assay was performed in a microtiter plate in duplicate as follows. NK cells were isolated from 100 ml of normal human donor whole blood using negative selection (ROSETTESEP™, #15065, StemCell Technologies). The assay diluent was RPMI™ 1640 and 0.25 mg/mL BSA. Chimeric antibody 2C8 and the Fc mutant thereof, in a serial dilution starting at 100 nM in 50 μ l, were incubated with 50 μ l of stable 293 cells expressing human LT α β (20,000) (see Example 11 for details) for 30 minutes at room temperature. 50 μ L of NK cells (120,000) were added and incubated for an additional four hours at 37°C. Plates

were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes, and 100 μ l of supernatant was transferred to a 96-flat-bottom microwell plate. The level of cell lysis was determined by measuring the amount of lactate dehydrogenase (LDH kit, #1-644-793, Roche) released from lysed cells. 100 μ l of LDH kit reaction mixture was added to 100 μ l of supernatant and incubated for up to 30 minutes. Plates were read at 490 nm. Controls included target:effector cells in the absence of antibody (for antibody-independent lysis), target cells alone with 1% TRITON X-100TM surfactant (for total lysis), and antibody ADCC negative and positive controls.

FIG. 16 shows that anti-LT α antibody 2C8 lysed a 293-human LT $\alpha\beta$ -expressing cell line in the ADCC assay, but the corresponding Fc mutant monoclonal antibody did not.

EXAMPLE 17: Anti-LT α monoclonal antibody blocks cytokine and chemokine secretion in 3T3 and HUVEC cells

HUVEC and 3T3 cells were cultured in the presence of human LT α 3 (100 ng/ml; R&D Systems Inc.) or human LT α 1 β 2 (200 ng/ml; R&D Systems Inc.) for 24 hours using human or murine reagents, respectively. Neutralization of the effect of LT α trimers with chimeric 2C8 or S5H3 anti-LT α antibodies (chimeric 2C8 with HUVEC, and hamster-mouse chimeric S5H3 with murine 3T3 cells) was determined using a static dose of 10-0 μ g/ml. Supernatants were assayed for human RANTES, IL-6, IP-10, and IL-8 for the HUVEC evaluation; or murine RANTES, IL-6, IP-10, and KC for the 3T3 evaluation, using standard LINCOPLEXTM kits and read on a LUMINEXTM plate reader.

FIG. 17A-H show that the anti-LT α antibody, versus an isotype control and as compared to unstimulated cells, blocked cytokine and chemokine secretion in HUVEC cells, with Figures 17A-17D, respectively, showing KC/IL-8, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 1 β 2, and Figures 17E-17H, respectively, showing KC/IL-8, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 3.

FIG. 17I-P show that the anti-LT α antibody, versus an isotype control and as compared to unstimulated cells, blocks cytokine and chemokine secretion in 3T3 cells, with Figures 17I-17L, respectively, showing KC, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 1 β 2, and Figures 17M-17P, respectively, showing KC, RANTES, IP10, and IL-6 with LT α 3.

In summary, the preferred antibodies herein against LT α :

- 1) Block LT α 3
- 2) Deplete LT α -positive cells by binding LT α as target, which is complexed with LT β on the cell surface. The data that depletion is important are the *in vivo* data

comparing wild-type with the Fc (DANA) mutant – for mouse: CIA, AIA (Figs 4 and 5); for human: human SCID mice with 2C8 (Fig. 9) and ADCC assay (Fig. 16)

3) Block $LT\alpha\beta$ function

4) Target any cell expressing $LT\alpha$, including T-, B-, and possibly or likely any Th1- or Th17- or Th2-driven disease (and NK cells), without being limited to any one theory.

Diseases expected to benefit from treatment with the antibodies herein include RA, IBD, psoriasis, MS, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, myasthenia gravis, and lupus, especially, RA, MS, lupus (*e.g.*, SLE and LN), and IBD, including Crohn's disease and UC.

EXAMPLE 18: Affinity-matured anti- $LT\alpha$ antibody 2C8.vX

Affinity maturation of the antibody 2C8 noted in Example 3 led to the humanized antibody 2C8.vX. The light-chain and heavy-chain variable regions and CDRs of this antibody are shown in Figures 18A and 18B, respectively, along with the CDRs.

The following is the DNA sequence that encodes the full-length heavy chain of anti- $LT\alpha$ 2C8.vX:

```

GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTC
CGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTATGTGATCCATTGGGT
CCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTTATAACAATCCTTATAAC
GCCGGCACCAACTATAACGAGAAGTTCAAGGGGCGCTTCACTATCAGTTCTGAC
AAGTCGAAAAACACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACT
GCCGTCTATTATTGTTCTCGACCCACAATGCTCCCATGGTTCGCCTACTGGGGTCA
AGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC

```

CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA

CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC

CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAA

CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG

5 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG

CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA

GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA

CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

(SEQ ID NO:104)

10 The following is the DNA sequence that encodes the full-length light chain of anti-

LT α 2C8.vX:

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGG

TCACCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGGCTGTGTCTTCGCTGTAGCCTGGTATCA

ACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTCTGCATCCCACCGTTAC

15 ACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGATCTGGGACGGATTTCACTCTGAC

CATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGGAATCTTAT

TCTACTCCTTGGACGTTCCGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTG

GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA

CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA

20 GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA

GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA

AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT

GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:105)

25 The following is the full-length heavy-chain amino acid sequence for 2C8.vX:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNYN

AGTNYNEKFKGRFTISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFAYWGQ

GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV

30 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP

PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ

ID NO:106)

152

The following is the full-length light-chain amino acid sequence for 2C8.vX:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQESYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
5 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:107)

Epitope mapping indicates that this molecule has a partial overlap with the receptor binding site. Activated rhesus T and B cells express surface LT $\alpha\beta$. The antibody 2C8.vX bound (crossreacted with) rhesus surface LT $\alpha\beta$ (as determined by FACS) and rhesus soluble LT $\alpha 3$ (as determined by FORTEBIO™ octet).

10 FIG. 19A and 19B show, respectively, ELISAs of LT $\alpha 3$ and LT $\alpha 1\beta 2$ binding of 2C8.vX antibodies in comparison to isotype control/TNFRIL.Fc. These ELISAs were performed in the same way as described in Example 10 above using human LT $\alpha 3$ and in Example 11 using LT $\alpha 1\beta 2$. The EC₅₀ values of these same antibodies to LT $\alpha 3$ and LT $\alpha 1\beta 2$ are 1.03 nM for TNFRIL.Fc and 0.05 nM for 2C8.vX to LT $\alpha 3$, and no binding of TNFRIL.Fc
15 and 0.34 nM for 2C8.vX to LT $\alpha 1\beta 2$. The results show that 2C8.vX bound much better than TNFRIL.Fc in both cases.

FIG. 20A and 20B show, respectively, blocking of human LT $\alpha 3$ and LT $\alpha 1\beta 2$ by 2C8.vX antibodies in comparison to isotype control/TNFRIL.Fc using the assay for testing blocking of human LT-induced cytotoxicity described in Example 15 above. The IC₅₀ values
20 of these same antibodies to LT $\alpha 3$ and LT $\alpha 1\beta 2$ are 0.83 nM for TNFRIL.Fc and 0.29 nM for 2C8.vX to LT $\alpha 3$, with no isotype blocking, and 0.31 nM for 2C8.vX to LT $\alpha 1\beta 2$, with no isotype blocking. The results show that 2C8.vX blocked LT $\alpha 3$ better than TNFRIL.Fc.

FIG. 21 relates to a functional assay showing inhibition of ICAM1 upregulation by LT $\alpha 3$ on HUVEC cells, using the protocol described in Example 14 above. FIG. 21 shows a
25 comparison of how various molecules blocked LT $\alpha 3$ in this functional assay. Specifically, isotype control, 2C8.vX, and TNFRIL.Fc were compared. The results show that both antibodies were able to block LT $\alpha 3$ in this assay.

FIG. 22 relates to a functional assay showing blocking of LT $\alpha 1\beta 2$ using 293-LT β R cells, using the protocol described in Example 15 above. FIG. 22 shows a comparison of
30 how various molecules blocked LT $\alpha 1\beta 2$ in this functional assay. Specifically, isotype control and 2C8.vX were compared along with unstimulated cells. The results show that 2C8.vX was able to block LT $\alpha 1\beta 2$ in this assay, with an IC₅₀ of about 5 nM.

FIG. 23 shows ADCC activity of 2C8.vX using the protocol set forth in Example 16 involving 293-LT α 1 β 2 cells. 2C8.vX was compared with the 2C8.vX DANA mutant and isotype control. The results show that 2C8.vX had ADCC activity, whereas the DANA mutant did not.

FIG. 24 shows GVHD survival results with 2C8.vX and CTLA4-Fc, as compared to controls (Fc mutant and isotype control) in a human SCID model, using the same protocol as described above in Example 9, terminating in three to four weeks. The results indicate that CTLA4-Fc and 2C8.vX prolonged survival in this model, and thus were effective at depleting LT α cells, but not the controls 2C8.vX-DANA mutant and human IgG1 isotype control antibody.

FIG. 25A-D show that the 2C8.vX antibody depleted LT α 1 β 2-expressing T and B cells in the human SCID GVHD model. In this protocol, SCID mice were reconstituted with PBMCs purified from a LEUKOPACKTM (available from blood banks such as Interstate Blood Bank, Memphis, TN) of a normal donor by FICOLLTM polysaccharide gradient. All mice (n=10/group) were sub-lethally irradiated with 350 rads using a Cesium 137 source. Two hours after irradiation, mice were injected with 50 million human PBMCs/mouse in 200 μ l PBS intrasplenically. One day after cell injection, mice were treated i.p. either with 300 μ g of human IgG1 isotype control antibody, 2C8.vX, or 2C8.vX DANA mutant in 100 μ l saline for one day. On Day 2 after irradiation, the splenocytes of the mice were labeled with 5- (and 6-)carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), and the absolute cell number (total CFSE positive cells) was measured and the percentage of cells in CFSE peaks was measured after electronically gating on CD4⁺, CD8⁺, and CD19⁺ cells. For this three-color staining, the following monoclonal antibodies were used: PE-labeled anti-CD4, PE-labeled anti-CD8, and PE-labeled CD19. Stained cells were analyzed on a FACSCANTM or FACSCALIBURTM instrument.

The results in FIG. 25A show total CFSE-positive human cells at day 2 for isotype control, 2C8.vX, and 2C8.vX.DANA mutant, and indicate that depletion was best with the vX antibody. FIG. 25B-D show the results of gating using the CD4, CD8, and CD19 antibodies, respectively, indicating that the vX antibody was best at depleting LT α β -positive T and B cells as compared to isotype control and the DANA mutant.

In summary, the antibody 2C8.vX depletes LT-expressing cells in an *in vitro* ADCC assay and *in vivo* in two human SCID GVHD models. It also blocks LT α 3 and LT α 1 β 2 in functional cell assays using HUVEC cells and 293-LT β R cells, respectively. Further, it

cross-reacts with non-human primate (NHP) lymphotoxin as determined by activated rhesus primary cells and the LT α 3 rhesus protein.

EXAMPLE 19: Affinity matured anti-LT α antibody 3F12.v14

5 Affinity maturation of the antibody 3F12 noted above led to the humanized antibody 3F12.v14. The light-chain and heavy-chain variable regions and CDRs of this antibody are shown in Figures 26A and 26B, respectively, along with the CDRs.

When tested for binding and blocking LT α 3 and LT α β using the assays noted above, 3F12.v14 bound and blocked these molecules as well as did antibody 2c8.vX.

EXAMPLE 20: Afucosylated 2C8.vX

10 The antibodies herein may be altered so that they lack fucose by culturing them using a cell line or technology disclosed in US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; US 2006/0063254; US 2006/0064781; US 2006/0078990; US 2006/0078991; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); or Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614-622 (2004). Examples of cell lines producing defucosylated antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka *et al., Arch. Biochem. Biophys.*, 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 A1 (Presta) and WO 2004/056312 A1 (Adams *et al.*, especially at Example 11), and knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8*, knock-out CHO cells (Yamane-Ohnuki *et al. supra*).

25 In fact, the antibody 2C8.vX was afucosylated to produce an antibody called anti-LTa 2C8.vX AF. This molecule was generated using a stable CHO cell line having a *FUT8* knock-out gene as described by the method in Yamane-Ohnuki *et al., supra*. It is 100% afucosylated.

30 The biophysical properties of 2C8.vX (including blocking and binding data) were not substantially changed upon afucosylation thereof, except for the ADCC. The ADCC properties of the wild-type and afucosylated molecules were determined by carrying out the experiments using the protocol set forth in Example 16 involving 293-LT α 1 β 2 cells. The results are shown in Fig. 27. The figure shows that the afucosylated antibody anti-LTa

2C8.vX AF has about a ten-fold increase over the wild-type (WT) antibody (produced in a normal CHO cell line as described above).

EXAMPLE 21: Underfucosylated 2C8.vX

5 As an alternative way to achieve high yields of non-fucosylated antibodies in mammalian cells, an RNAi approach may be employed to knock down the expression of the *FUT8* gene. A plasmid may be used to produce short hairpin siRNA consisting of 19nt (nucleotide) sense siRNA sequence specific to the gene of *FUT8*, linked to its reverse complementary antisense siRNA sequence by a short spacer (9nt hairpin loop), followed by 10 5-6 U's at the 3' end.

Four different RNAi probes are designed to target the different regions based on the available CHO *FUT8* DNA sequence.

For testing the efficacy of these RNAi probes, a FLAG-tagged *FUT8* fusion protein is constructed using the available CHO *FUT8* DNA sequence (Genbank accession no.

15 P_AAC63891). RT-PCR is performed with *FUT8* primers and the resulting PCR fragment fused with 5' FLAG tag sequence. The tagged *FUT8* fragment is cloned into an expression vector. The RNAi probe plasmid and flag-tagged *FUT8* plasmid are cotransfected into CHO cells. Cell lysate is extracted 24 hours after transfection and the *FUT8* fusion protein level analyzed using anti-flag M2 antibody by immuno-blotting. In the presence of RNAi probes, 20 the fusion protein expression is expected to be significantly inhibited in most of the cases.

The two probes showing the best inhibitory effect are transfected into a CHO cell line expressing an antibody as described herein, such as 2C8.vX. The expressed anti-LT-alpha antibody is purified by a protein A column and submitted for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectral analysis of asparagine- 25 linked oligosaccharides (including fucose content) and FcγR binding assay as described below.

Methods for analyzing the oligosaccharides by MALDI-TOF are conducted generally as follows: N-linked oligosaccharides are released from recombinant glycoproteins using the peptide-N-glycosidase -F (PNGase F) procedure of Papac *et al.*, *Glycobiology* 8, 445-454 30 (1998). Briefly, the wells of a 96-well polyvinylidene difluoride (PVDF)-lined microtitre plate (Millipore, Bedford, MA) are conditioned with 100 μl methanol that is drawn through the PVDF membranes by applying vacuum to the MILLIPORE™ multiscreen vacuum manifold. The conditioned PVDF membranes are washed with 3 X 250 μl water. Between

all wash steps the wells are drained completely by applying gentle vacuum to the manifold. The membranes are washed with reduction and carboxymethylation buffer (RCM) consisting of 6 M guanidine hydrochloride, 360 mM TRIS buffer, 2 mM EDTA, pH 8.6. Glycoprotein samples (50 µg) are applied to individual wells, again drawn through the PVDF membranes
5 by gentle vacuum and the wells washed with 2 X 50 µl of RCM buffer. The immobilized samples are reduced by adding 50 µl of a 0.1 M dithiothreitol (DTT) solution to each well and incubating the microtitre plate at 37°C for 1 hr. DTT is removed by vacuum and the wells are washed 4 x 250 µl water. Cysteine residues are carboxylmethylated by the addition of 50 µl of a 0.1 M iodoacetic acid (IAA) solution that is freshly prepared in 1 M NaOH and
10 diluted to 0.1 M with RCM buffer.

Carboxymethylation is accomplished by incubation for 30 min in the dark at ambient temperature. Vacuum is applied to the plate to remove the IAA solution and the wells are washed with 4 x 250 µl purified water. The PVDF membranes are blocked by the addition of 100 µl of 1% PVP360TM (polyvinylpyrrolidone 360,000 MW) (Sigma) solution and
15 incubation for 30 minutes at ambient temperature. The PVP-360TM solution is removed by gentle vacuum and the wells are washed 4 x 250 µl water. Peptide: N-Glycosidase F (PNGase FTM) amidase (New England Biolabs, Beverly, MA), at 25 µl of a 25 Unit/ml solution in 10 mM TRIS acetate, pH 8.3, is added to each well and the digest proceeds for 3 hr at 37°C. After digestion, the samples are transferred to 500 µl EPPENDORFTM tubes and
20 2.5 µl of a 1.5 M acetic acid solution is added to each sample. The acidified samples are incubated for two hrs at ambient temperature to convert the oligosaccharides from the glycosylamine to the hydroxyl form. Prior to MALDI-TOF mass spectral analysis, the released oligosaccharides are desalted using a 0.7-ml bed of cation-exchange resin (AG50W-X8 resin in the hydrogen form) (Bio-Rad, Hercules, CA) slurry packed into compact reaction
25 tubes (US Biochemical, Cleveland, OH).

For MALDI-TOF mass-spectral analysis of the samples in the positive mode, the desalted oligosaccharides (0.5 µl aliquots) are applied to the stainless target with 0.5 µl of the 2,5 dihydroxybenzoic acid matrix (sDHB) that is prepared by dissolving 2 mg 2,5 dihydroxybenzoic acid with 0.1 mg of 5-methoxysilylic acid in 1 ml of 1 mM NaCl in 25%
30 aqueous ethanol. The sample/matrix mixture is vacuum dried and then allowed to absorb atmospheric moisture prior to analysis. Released oligosaccharides are analyzed by MALDI-TOF on a PERSEPTIVE BIOSYSTEMS VOYAGER-ELITETM mass spectrometer. The mass spectrometer is operated in the positive mode at 20 kV with the linear configuration and

utilizing delayed extraction. Data are acquired using a laser power of approximately 1100 and in the data summation mode (240 scans) to improve the signal to noise ratio. The instrument is calibrated with a mixture of standard oligosaccharides and the data are smoothed using a 19-point Savitsky-Golay algorithm before the masses are assigned.

5 Integration of the mass-spectral data is achieved using the CAESAR 7.2TM data analysis software package (SciBridge Software).

Binding of control and test materials to the human Fcγ receptors can be assessed using modified versions of procedures originally described by Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 276:6591-604 (2001).

10 For confirmation that the RNAi-transfected cells do have less FUT8 RNA expression, a Northern blot can be performed using RNA samples extracted from the transfected cells 24 hours after transfection. Total RNA from cells containing a control plasmid (random mouse DNA sequence, no homology to any known mouse proteins) and two RNAi plasmids can be purified and hybridized with a 300-bp probe. The knock down of endogenous α 1,6-
15 fucosyltransferase RNA can be further confirmed by quantitative PCR.

Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture
20 Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
hybridoma murine Lymphotoxin alpha2 beta1 s5H3.2.2	PTA-7538	April 19, 2006

This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent
25 Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S.
30 patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC § 122.

and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

5 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

10 The foregoing written description is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the example presented herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody comprising at least one complementarity-determining region (CDR) sequence selected from the group consisting of:
- 5 (a) a CDR-L1 sequence comprising amino acids A1-A11, wherein A1-A11 is KASQAVSSAVA (SEQ ID NO:1) or RASQAVSSAVA (SEQ ID NO:2), or comprising amino acids A1-A17, wherein A1-A17 is KSSQSLLYSTNQKNFLA (SEQ ID NO:3) or KSSQSLLYSANQKNFLA (SEQ ID NO:4) or KSSQSLLYSTNQKNALA (SEQ ID NO:6), where N is any amino acid;
- 10 (b) a CDR-L2 sequence comprising amino acids B1-B7, wherein B1-B7 is SASHRYT (SEQ ID NO:7) or WASTRDS (SEQ ID NO:8);
- (c) a CDR-L3 sequence comprising amino acids C1-C9, wherein C1-C9 is QQHYSTPWT (SEQ ID NO:9) or QENYSTPWT (SEQ ID NO:11) or QQYYSPRT (SEQ ID NO:13) or QQYASYPRT (SEQ ID NO:14) or QQYYAYPRT (SEQ ID NO:15), where N is any amino acid;
- 15 (d) a CDR-H1 sequence comprising amino acids D1-D10, wherein D1-D10 is GYTFTSYVIH (SEQ ID NO:16) or GYTFSSYWIE (SEQ ID NO:17);
- 20 (e) a CDR-H2 sequence comprising amino acids E1-E17, wherein E1-E17 is YNNPYNDGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18) or EISPGSGSTNYNEEFKG (SEQ ID NO:19) or YNNPYNAGTNYNEKFKG (SEQ ID NO:101) or EINPGSGSTIYNEKFKG (SEQ ID NO:110), wherein N is any amino acid; and
- 25 (f) a CDR-H3 sequence comprising amino acids F1-F9, wherein F1-F9 is PTMLPWFAY (SEQ ID NO:20), or comprising amino acids F1-F5, wherein F1-F5 is GYHGY (SEQ ID NO:21) or GYHGA (SEQ ID NO:22).
2. The antibody of claim 1 wherein SEQ ID NO:3 is KSSQSLLYSTAQKNFLA (SEQ ID NO:5).
- 30 3. The antibody of claim 1 or 2 wherein SEQ ID NO:11 is QESYSTPWT (SEQ ID NO:10) or QEVYSTPWT (SEQ ID NO:12).
4. The antibody of any one of claims 1-3 wherein the CDR-L1 sequence is SEQ ID NO:2 or 3 or 4 or 6.

5. The antibody of any one of claims 1-3 comprising either all of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or all of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or all of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or all of SEQ ID NOS:16, 101, and 20.
6. The antibody of any one of claims 1-3 comprising either all of SEQ ID NOS:3, 8, and 13, or all of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or all of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or all of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15, or all of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or all of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.
7. The antibody of any one of claims 1-6 comprising (i) all of the CDR-L1 to CDR-L3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 and 9, or of SEQ ID NOS:1 or 2 and 7 or 8 and 11, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 13; or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 13, or of SEQ ID NOS:3, 8, and 14 or 15, or of SEQ ID NOS:4, 5, or 6, 8, and 14 or 15, and (ii) all of the CDR-H1 to CDR-H3 amino acid sequences of SEQ ID NOS:16, 18, and 20, or of SEQ ID NOS:16, 101, and 20, or of SEQ ID NOS:17, 19, and 21 or 22, or of SEQ ID NOS:17, 110, and 21.
8. The antibody of any one of claims 1-7 comprising a human κ subgroup 1 consensus framework sequence.
9. The antibody of any one of claims 1-8 comprising a heavy-chain human subgroup III consensus framework sequence.
10. The antibody of claim 9 wherein the framework sequence comprises a substitution at position 71, 73, or 78.
11. The antibody of claim 10 wherein said substitution is R71A, N73T, or N78A or a combination thereof.
12. The antibody of any one of claims 1-11 that binds to lymphotoxin- α_3 trimer (LT α_3) and blocks the interaction of LT α_3 with tumor necrosis factor receptor-I (TNFRI) and tumor necrosis factor receptor-II (TNFRII).
13. The antibody of any one of claims 1-12 that binds to a lymphotoxin- $\alpha\beta$ heterodimer (LT $\alpha\beta$) complex.
14. The antibody of any one of claims 1-13 that blocks LT $\alpha\beta$ function.
15. The antibody of any one of claims 1-14 that has an Fc region, and decreases levels of inflammatory cytokines associated with rheumatoid arthritis in an *in vitro* arthritis assay.
16. The antibody of any one of claims 1-15 that blocks the interaction of LT $\alpha\beta$ with lymphotoxin-beta receptor (LT β -R).

17. The antibody of any one of claims 1-16 that depletes LT α -positive cells.
18. The antibody of any one of claims 1-17 that modulates LT α β -expressing cells.
19. The antibody of any one of claims 1-18 that is chimeric or humanized.
20. The antibody of claim 19 that is humanized.
- 5 21. The antibody of claim 20 wherein at least a portion of its framework sequence is a human consensus framework sequence.
22. The antibody of any one of claims 1-21 wherein said antibody binds LT α with an affinity of at least about 10^{-12} M.
23. The antibody of any one of claims 1-22 that is of the IgG isotype.
- 10 24. The antibody of claim 23 wherein the IgG is IgG1 or IgG2a.
25. The antibody of any one of claims 15-24 wherein the Fc region is a wild-type Fc region.
26. The antibody of any one of claims 15-24 further comprising one or more amino acid substitutions in its Fc region that result in it having increased antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) function as compared to the same antibody having a native-sequence Fc region.
- 15 27. The antibody of claim 26 further comprising one to three amino acid substitutions in its Fc region.
28. The antibody of claim 26 wherein the Fc region has the amino acid substitutions at any one or any combination of positions that are 268D, or 298A, or 326D, or 333A, or 334A, or 298A together with 333A, or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E and 272Y and 254T and 256E, or 250Q together with 428L, or 265A, or 297A, wherein the 265A substitution is in the absence of 297A and the 297A substitution is in the absence of 265A.
- 20 29. The antibody of any of claims 20-28 having a monovalent affinity to human LT α that is about the same as or greater than the monovalent affinity to human LT α of a murine antibody produced by a hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number PTA-7538 (hybridoma murine Lymphotoxin alpha2 beta1 s5H3.2.2).
- 30

30. The humanized antibody of claim 29 wherein the monovalent affinity is expressed as a Kd value.
31. The humanized antibody of claim 30 wherein the monovalent affinity is measured by optical biosensor or radioimmunoassay.
- 5 32. An anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:23 or 24, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:25 or 26, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:23 and 25 or comprising both SEQ ID NOS:24 and 26.
- 10 33. An anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:27 or 28, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:29 or 30 or 31, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:27 and 29, or comprising both SEQ ID NOS:27 and 30, or comprising both SEQ ID NOS:27 and 31, or comprising both SEQ ID NOS:28 and 30, or comprising both SEQ ID NOS:28 and 31.
- 15 34. An anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:102, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:103, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:102 and 103.
- 20 35. An anti-lymphotoxin- α (LT α) antibody having a light-chain variable domain comprising SEQ ID NO:108, or a heavy-chain variable domain comprising SEQ ID NO:109, or having light-chain and heavy-chain variable domains comprising both SEQ ID NOS:108 and 109.
36. An antibody of any one of claims 1-35 having reduced fucose relative to the amount of fucose on the same antibody produced in a wild-type Chinese hamster ovary cell.
- 25 37. The antibody of claim 35 having no fucose.
38. An antibody composition comprising the antibodies of any one of claims 1-37 having an Fc region, wherein about 20-100% of the antibodies in the composition comprise a mature core carbohydrate structure in the Fc region that lacks a fucose.
- 30 39. The composition of claim 38 wherein the antibody comprises an Fc region that has been altered to change one or more of the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), or pharmacokinetic properties of the antibody compared to a wild-type IgG Fc sequence by substituting an amino acid selected from the group consisting of A, D, E, L, Q, T, and Y at any

- one or any combination of positions of the Fc region selected from the group consisting of: 238, 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438 and 439.
40. The composition of claim 38 or 39 wherein the antibody has antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity in the presence of human effector cells or has increased ADCC activity in the presence of human effector cells compared to the otherwise same antibody comprising a human wild-type IgG1 Fc.
41. The composition of claim 38 wherein the antibody further comprises an Fc substitution that is 268D or 326D or 333A together with 334A, or 298A together with 333A, or 298A together with 334A, or 239D together with 332E, or 239D together with 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332A, or 239D together with 268D and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 332E, or 239D together with 268D and 283L and 298A and 326A and 332E, or 239D together with 330L and 332E.
42. The composition of claim 38 wherein the antibody binds an FcγRIII.
43. The composition of claim 38 wherein the antibody binds the FcγRIII with better affinity, or mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) more effectively, than a glycoprotein with a mature core carbohydrate structure including fucose attached to the Fc region of the glycoprotein.
44. The composition of any one of claims 38-43 wherein the antibody has been produced by a Chinese hamster ovary (CHO) cell.
45. The composition of claim 44 wherein the CHO cell is a Lec13 cell.
46. The composition of any one of claims 38-45 wherein the antibody has been produced by a mammalian cell lacking a fucosyltransferase gene.
47. The composition of claim 46 wherein the fucosyltransferase gene is the *FUT8* gene.
48. The composition of claim 38 wherein the antibody is free of bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) attached to its mature core carbohydrate structure.
49. The composition of claim 38 wherein the antibody has bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) attached to its mature core carbohydrate structure.

50. The composition of claim 38 wherein the antibody has one or more galactose residues attached to its mature core carbohydrate structure.
51. The composition of claim 38 wherein the antibody is free of one or more galactose residues attached to its mature core carbohydrate structure.
- 5 52. The composition of claim 38 wherein the antibody has one or more sialic acid residues attached to its mature core carbohydrate structure.
53. The composition of claim 38 wherein the antibody is free of one or more sialic acid residues attached to its mature core carbohydrate structure.
54. The composition of claim 38 that comprises at least about 2% afucosylated
10 antibodies.
55. The composition of claim 38 that comprises at least about 4% afucosylated antibodies.
56. The composition of claim 38 that comprises at least about 10% afucosylated antibodies.
- 15 57. The composition of claim 38 that comprises at least about 19% afucosylated antibodies.
58. The composition of claim 38 that comprises about 100% afucosylated antibodies.
59. An anti-idiotypic antibody that specifically binds the antibody of any one of claims 1-37.
- 20 60. A composition comprising the antibody of any one of claims 1-37 and a carrier.
61. The composition of claim 60 further comprising a second medicament, wherein the anti-LT α antibody is a first medicament.
62. The composition of claim 61 wherein the second medicament is a an
25 immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker, a BAFF antagonist, a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), an integrin antagonist, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), a cytokine antagonist, or a combination thereof.
63. A hybridoma deposited at the American Type Culture Collection (ATCC) on April 19, 2006 under the Deposit No. PTA-7538.
- 30 64. An antibody that is secreted by a hybridoma of claim 63.
65. An isolated nucleic acid encoding the antibody of any one of claims 1-37.
66. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 65.
67. A host cell comprising the nucleic acid of claim 65.

- 68. A method of producing an antibody comprising culturing the host cell of claim 67 under conditions to produce the antibody and recovering the antibody.
- 69. A method of inhibiting lymphotoxin- α -activated cell proliferation, said method comprising contacting a cell or tissue with an effective amount of the antibody of any one of claims 1-37.
- 70. A method of treating an autoimmune disorder in a subject comprising administering to the subject an effective amount of the antibody of any one of claims 1-37.
- 71. The method of claim 70 wherein the autoimmune disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, lupus, Wegener's disease, inflammatory bowel disease (IBD), idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), autoimmune thrombocytopenia, multiple sclerosis (MS), psoriasis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies, myasthenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, Reynaud's syndrome, Sjögren's syndrome, glomerulonephritis, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, helicobacter-pylori gastritis, and chronic hepatitis C.
- 72. The method of claim 71 wherein the autoimmune disorder is rheumatoid arthritis, MS, Sjögren's syndrome, lupus, myasthenia gravis, or IBD.
- 73. The method of claim 72 wherein the autoimmune disorder is rheumatoid arthritis, IBD, lupus, or MS.
- 74. The method of claim 73 wherein the lupus is systemic lupus erythematosus or lupus nephritis, and the IBD is Crohn's disease or ulcerative colitis.
- 75. The method of any one of claims 70-74 wherein a second medicament is administered in an effective amount, wherein the anti-LT α antibody is a first medicament.
- 76. The method of claim 75 wherein the second medicament is more than one medicament.
- 77. The method of claim 75 or 76 wherein the second medicament is an immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker, a BAFF antagonist, a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), an integrin antagonist, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), a cytokine antagonist, or a combination thereof.
- 78. The method of claim 77 wherein the second medicament is a DMARD or methotrexate.

79. The method of any one of claims 70-78 wherein the subject has never been previously treated with a medicament for the disorder.
80. The method of claim 79 wherein the subject has never been previously treated with a TNF antagonist.
- 5 81. The method of any one of claims 70-78 wherein the subject has been previously treated with a medicament for the disorder.
82. The method of claim 81 wherein the subject has been previously treated with a TNF antagonist or a DMARD.
83. The method of any one of claims 70-82 wherein the antibody is a naked antibody.
- 10 84. The method of any one of claims 70-82 wherein the antibody is conjugated with another molecule.
85. The method of claim 84 wherein the other molecule is a cytotoxic agent.
86. The method of any one of claims 70-85 wherein the antibody is administered intravenously.
- 15 87. The method of any one of claims 70-85 wherein the antibody is administered subcutaneously.
88. The method of any one of claims 70-87 wherein the subject has rheumatoid arthritis and the antibody induces a major clinical response in the subject.
89. The method of any one of claims 70-88 wherein the subject has an abnormal level of
20 one or more regulatory cytokines, anti-nuclear antibodies (ANA), anti-rheumatoid factor (RF) antibodies, creatinine, blood urea nitrogen, anti-endothelial antibodies, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), infiltrating CD20 cells, anti-double stranded DNA (dsDNA) antibodies, anti-Sm antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-phospholipid antibodies, anti-ribosomal P
25 antibodies, anti-Ro/SS-A antibodies, anti-Ro antibodies, anti-La antibodies, antibodies directed against Sjögren's-associated antigen A or B (SS-A or SS-B), antibodies directed against centromere protein B (CENP B) or centromere protein C (CENP C), autoantibodies to ICA69, anti-Smith antigen (Sm) antibodies, anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, anti-ribosomal P antibodies, autoantibodies staining the
30 nuclear or perinuclear zone of neutrophils (pANCA), anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, cross-reactive antibodies to GM1 ganglioside or GQ1b ganglioside, anti-acetylcholine receptor (AChR), anti-AChR subtype, or anti-muscle specific tyrosine kinase (MuSK) antibodies, serum anti-endothelial cell antibodies, IgG or anti-

- desmoglein (Dsg) antibodies, anti-centromere, anti-topoisomerase-1 (Scl-70), anti-RNA polymerase or anti-U3-ribonucleoprotein (U3-RNP) antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies, anti-mitochondrial (AMA) or anti-mitochondrial M2 antibodies, anti-thyroid peroxidase (TPO), anti-thyroglobin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-nucleic (AN), anti-actin (AA) or anti-smooth muscle antigen (ASM) antibodies, IgA anti-endomysial, IgA anti-tissue transglutaminase, IgA anti-gliadin or IgG anti-gliadin antibodies, anti-CYP21A2, anti-CYP11A1 or anti-CYP17 antibodies, anti-ribonucleoprotein (RNP), or myositis-specific antibodies, anti-myelin associated glycoprotein (MAG) antibodies, anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies, anti-GM1 ganglioside, anti-sulfate-3-glycuronyl paragloboside (SGPG), or IgM anti-glycoconjugate antibodies, IgM anti-ganglioside antibody, anti-thyroid peroxidase (TPO), anti-thyroglobin (TG) or anti-thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies, anti-myelin basic protein or anti-myelin oligodendrocytic glycoprotein antibodies, IgM rheumatoid factor antibodies directed against the Fc portion of IgG, anti-Factor VIII antibodies, or a combination thereof.
90. The method of any one of claims 70-89 wherein the antibody is administered no more than about once every other week.
91. The method of claim 90 wherein the antibody is administered about once a month.
92. An article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises the antibody of any one of claims 1-37, and a package insert indicating that the composition can be used to treat an autoimmune disorder.
93. The article of claim 92 further comprising a container comprising a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, and further comprising instructions on the package insert for treating the subject with the second medicament.
94. The article of claim 93 wherein the second medicament is a an immunosuppressive agent, an antagonist that binds a B-cell surface marker, a BAFF antagonist, a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), an integrin antagonist, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), a cytokine antagonist, or a combination thereof.
95. A method for advertising the antibody of any one of claims 1-37 or a pharmaceutically acceptable composition thereof comprising promoting, to a target

audience, the use of the antibody or pharmaceutical composition thereof for treating a patient or patient population exhibiting an autoimmune disease.

96. The method of claim 95 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis, lupus, multiple sclerosis, or an inflammatory bowel disease.
- 5 97. An article of manufacture comprising, packaged together, a pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1-37 and a pharmaceutically acceptable carrier and a label stating that the antibody or pharmaceutical composition is indicated for treating patients with an autoimmune disease.
- 10 98. The article of claim 97 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis, lupus, multiple sclerosis, or an inflammatory bowel disease.
99. The article of claim 97 or 98 further comprising a container comprising a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, further comprising instructions on the package insert for treating the patient with an effective amount of
- 15 the second medicament.
100. The article of claim 99 wherein the second medicament is a DMARD or methotrexate.
101. A method for packaging the antibody of any one of claims 1-37 or a pharmaceutical composition thereof comprising combining in a package the antibody or pharmaceutical composition of the antibody and a label stating that the antibody or
- 20 pharmaceutical composition is indicated for treating patients exhibiting an autoimmune disease.
102. The method of claim 101 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis, lupus, multiple sclerosis, or an inflammatory bowel disease.

1 / 32

2C8 Chimera Light Chain

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQAVSSAVAWYQOKPGQSPKLQIYSASHRYTGVPD
RFTGSGSGTDFTTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQUENCE ID NO:32)

2C8 Chimera Heavy Chain

EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYVIHWVKQKPGQGLEWIGYNNPYNDGTNY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGTTLTVSAAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQUENCE ID NO:33)

FIG. 1A

3F12 Chimera Light Chain:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQNFLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTR
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:34)

3F12 Chimera Heavy Chain:

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPGSGSTNY
NEEFKKGATFTADKSSNTAYIQLSSLSTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSSAKTTG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:35)

3F12 Chimera Heavy-chain Variable Region:

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPGSGSTNY
NEEFKKGATFTADKSSNTAYIQLSSLSTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:31)

FIG. 1B

WO 2008/063776

PCT/US2007/081154

2 / 32

Anti-LT α 3F12.2D3 Light-chain Variable Region:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQNFLAWYQQKPGQSPKLLIWASTRDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:36)

Anti-LT α 3F12.2D3 Light-chain Constant Region:

RADAAPT^{**VS**}IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG**SERQ**NGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLT**LT**KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:37)

(Highlighted in bold are residues that were identified from various chemical/enzymatic cleavages)

FIG. 1C**Anti-LT α 3F12.2D3 Heavy-chain Variable Region:**

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGLEWIGEISPGSGSTNYNEEF
KGKATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:38)

Anti-LT α 3F12.2D3 Heavy-chain Constant Region:

AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTM
SSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTTVDKLEPSGP**ISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPN**
IKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISW**FVNNVEVHTAQ**TQTHREDYN*STIRVVSTLPIQ
HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFN
PGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLN**MKTSKWEK**TDSFSCNVRHEGLKNYYL
KKTISRSPG (SEQ ID NO:39)

* Indicates glycosylation site

(Highlighted in bold are residues that were identified from various chemical/enzymatic cleavages)

FIG. 1D

3 / 32

Light Chain

	10	20	30	40
2C8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	[KASQAVSSAVA]	WYQOKP	
	* * * * *	*	*	
hu2C8.v2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASQAVSSAVA]	WYQOKP	
		** *		
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASQISNYLA]	WYQOKP	
	50	60	70	80
2C8	GQSPKLQIY [SASHRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**	* *	* *	
hu2C8.v2	GKAPKLQIY [SASHRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* * * * *			
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C8	EDLAVYYC [QQHYSTPWT]	FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:23)		
	* *	*		
hu2C8.v2	EDFATYYC [QQHYSTPWT]	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24)		
		** *		
hum KI	EDFATYYC [QQYNLSLPWT]	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:40)		

FIG. 2A

Heavy Chain

	10	20	30	40
2C8	EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKAS	[GYTFTSYVIH]	WVKQK	
	** * * *	*	*	
hu2C8.v2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYVIH]	WVRQA	
		* * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50	a	60	70
2C8	PGQGLEWIG [YNNPYNDGTNYNEKFKG]	KATLTSDKSSSTAYM		
	* *		* * *	
hu2C8.v2	PGKGLEWVG [YNNPYNDGTNYNEKFKG]	RATISSDKSKNTAYL		
	* * * * *	* * *		
hum III	PGKGLEWVS [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL		
	90	100	110	120
2C8	ELSSLTSEDSAVYYCSR [PTMLPWFAY]	WGQGTTLTVSA		
(SEQ ID NO:25)				
	** * *		** *	
hu2C8.v2	QMNSLRAEDTAVYYCSR [PTMLPWFAY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:26)				
		* * * * *		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRGGGSD-Y]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:41)				

FIG. 2B

4 / 32

Light Chain for 2C8.v7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:42)

Heavy Chain for 2C8.v7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNPYNDGTNY
NEKFKGRATISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)

Light Chain for 2C8.v12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:44)

Heavy Chain for 2C8.v12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNPYNDGTNY
NEKFKGRFTISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:45)

FIG. 2C

5 / 32

Light Chain

	10	20	abcdef 30	40
3F12	DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQKP	
	* *	** ** *		
hu3F12.v5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQKP	
		** ***** *		
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQSI-----NYLA]	WYQQKP	
		50	60	70
3F12	GQSPKLLIY	[WASTRDS]	GVPDRFTGSGSGTDFTLT	ISSVKAEDLAVY
	**		* *	*** *
hu3F12.v5	GKAPKLLIY	[WASTRDS]	GVPSRFGSGSGTDFTLT	ISSLQPEDFATY
		* ***		
hum kI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLT	ISSLQPEDFATY
		90	100	
3F12	YC	[QQYYSYPRT]	FGGGTKLEIKR	(SEQ ID NO:27)
			* *	
hu3F12.v5	YC	[QQYYSYPRT]	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:28)
		* * *		
hum kI	YC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:40)

FIG. 3A

Heavy Chain

	10	20	30	40
3F12	QGQLQQSGAELMKPGASVKISKAT	[GYTFSSYWIE]	WVKQR	
	** ** *	* ** *		* *
hu3F12.v5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GYTFSSYWIE]	WVRQA	
		* ***		
humhviii	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFSSYAMS]	WVRQA	
		50 a	60	70
3F12	PGHGLEWIG	[EISPGSGSTNYNEEFKG]	KATFTADKSSNTAYI	
	* *		* * *	*
hu3F12.v5	PGKGLEWVG	[EISPGSGSTNYNEEFKG]	RATFSADNSKNTAYL	
	* *	*** * ****	* * *	*
humhviii	PGKGLEWVS	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	abc	90	100	110
3F12	QLSSLTSEDSAVYYCAD	[GYH-G--Y]	WGQGTTLTVSSA	
(SEQ ID NO:29)				
	** ** *		**	
hu3F12.v5	QMNSL-RAEDTAVYYCAD	[GYH-G--Y]	WGQGTTLTVSSA	
(SEQ ID NO:30)				
		*	*** **	
humhviii	QMNSL-RAEDTAVYYCAR	[GRGGGSDY]	WGQGTTLTVSSA	
(SEQ ID NO:41)				

FIG. 3B

6 / 32

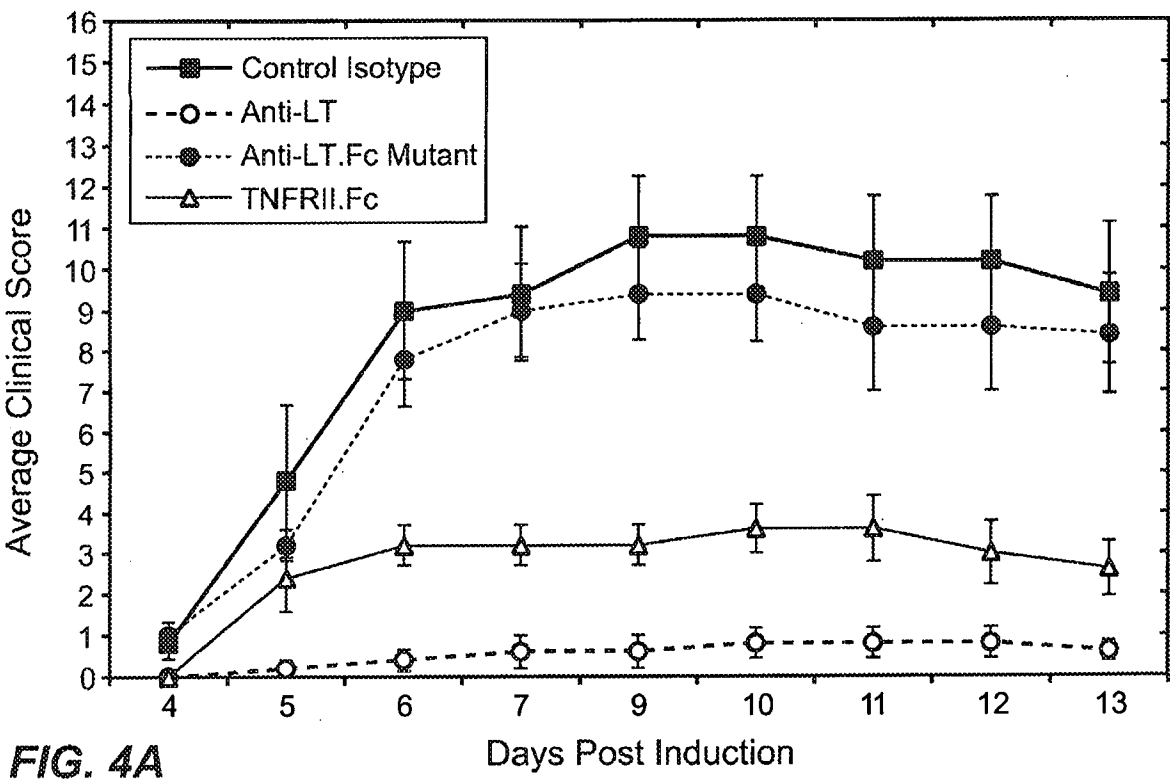


FIG. 4A

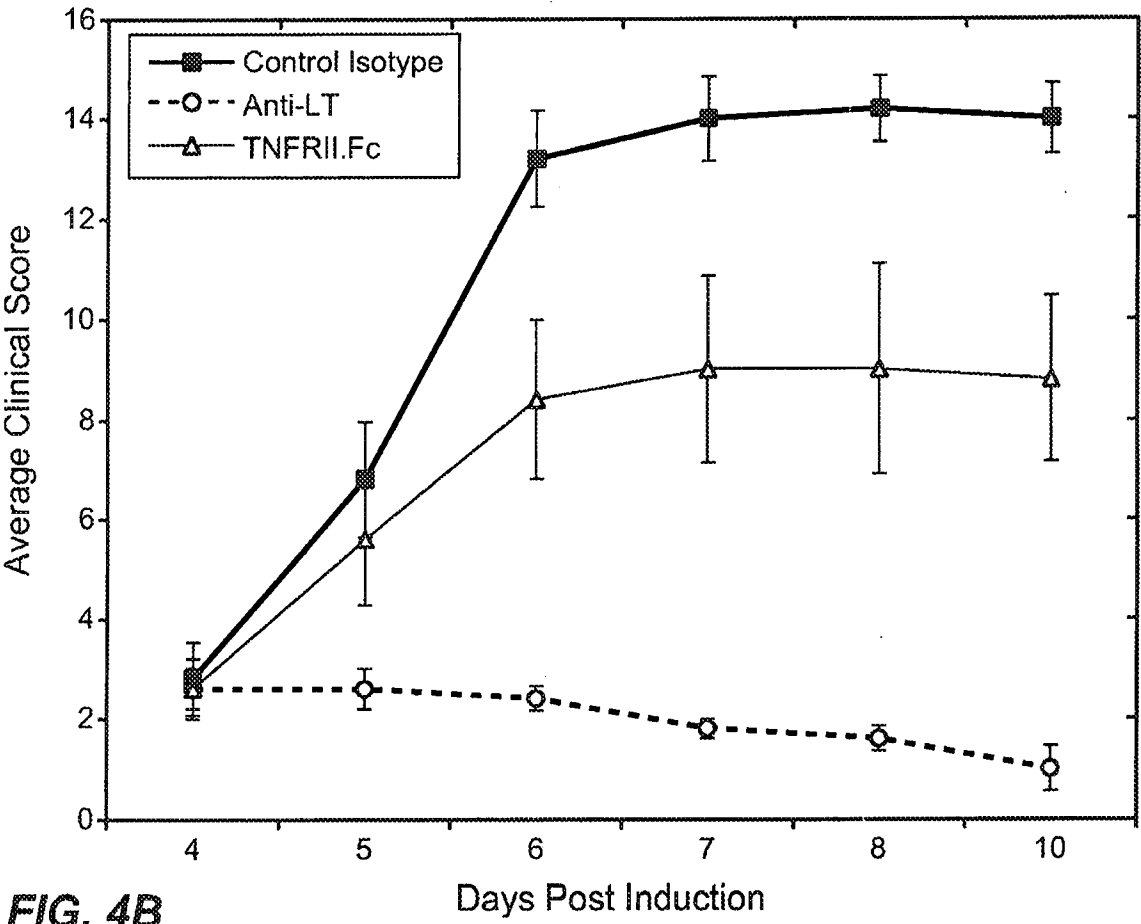


FIG. 4B

7 / 32

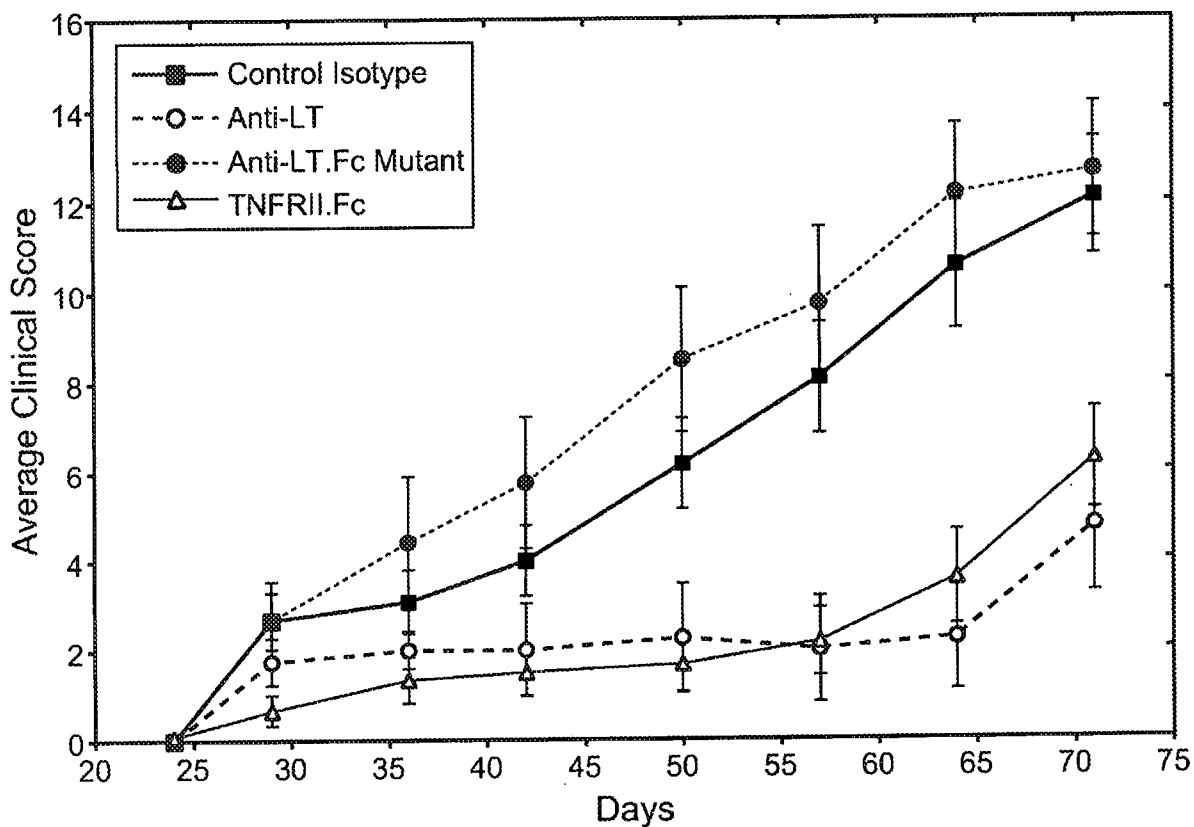


FIG. 5A

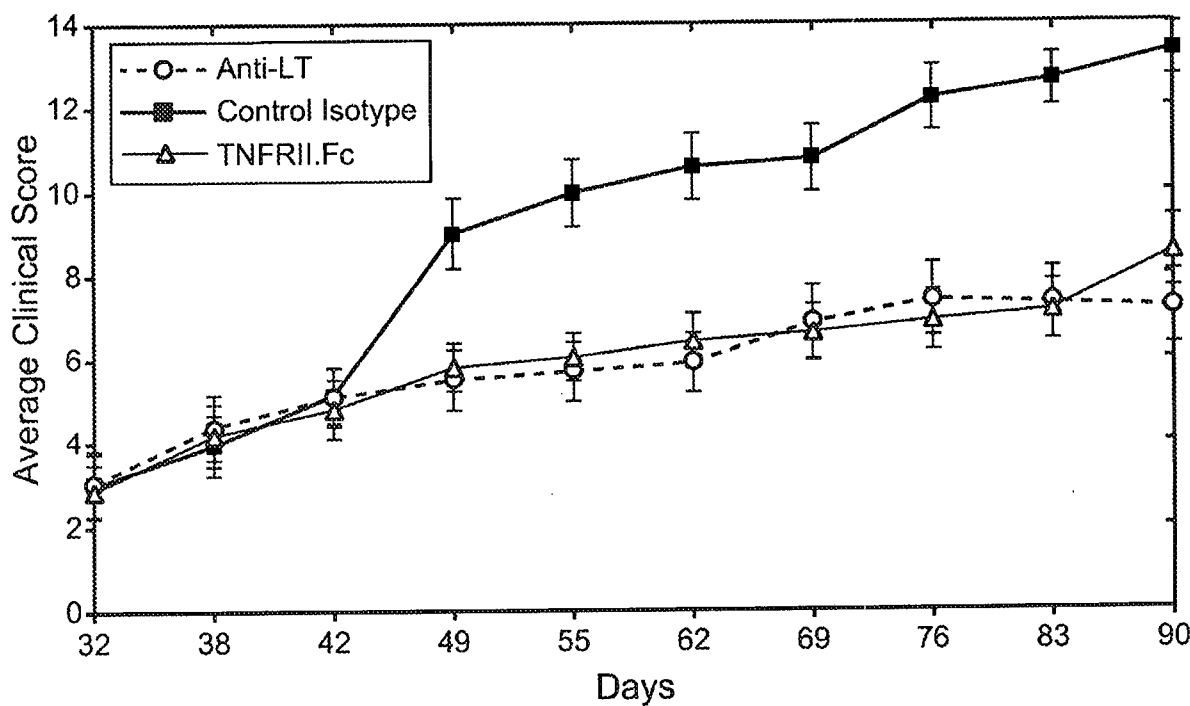


FIG. 5B

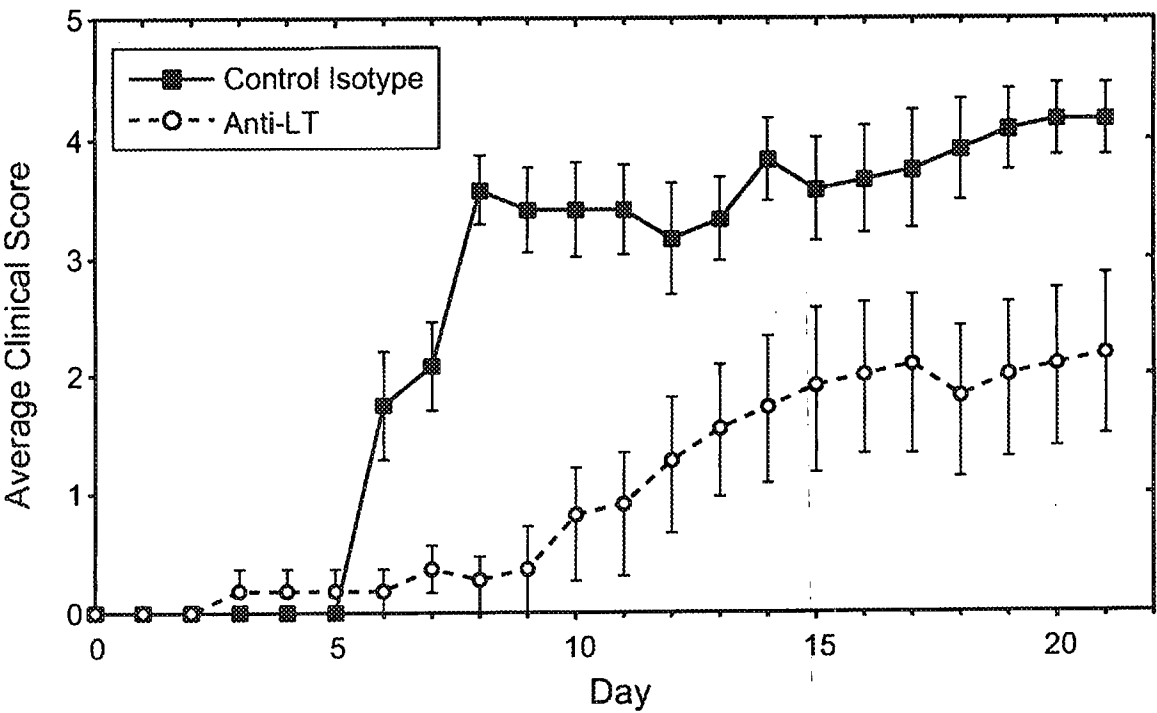


FIG. 6

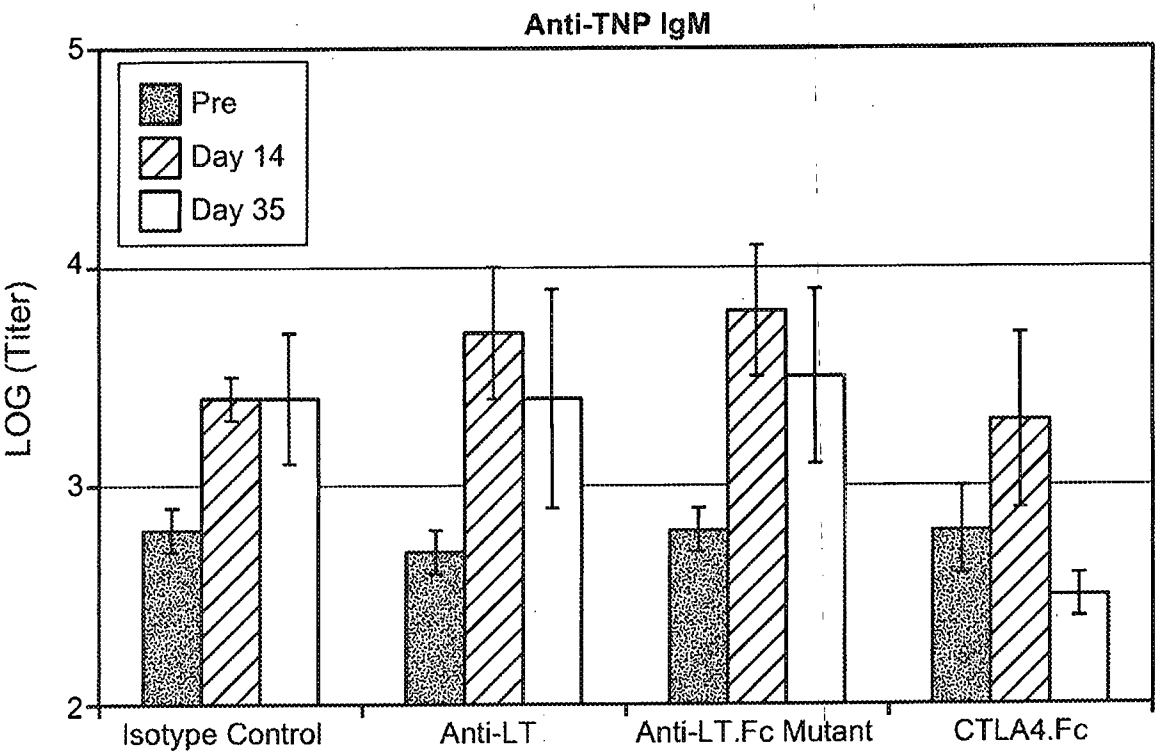


FIG. 7A

9 / 32

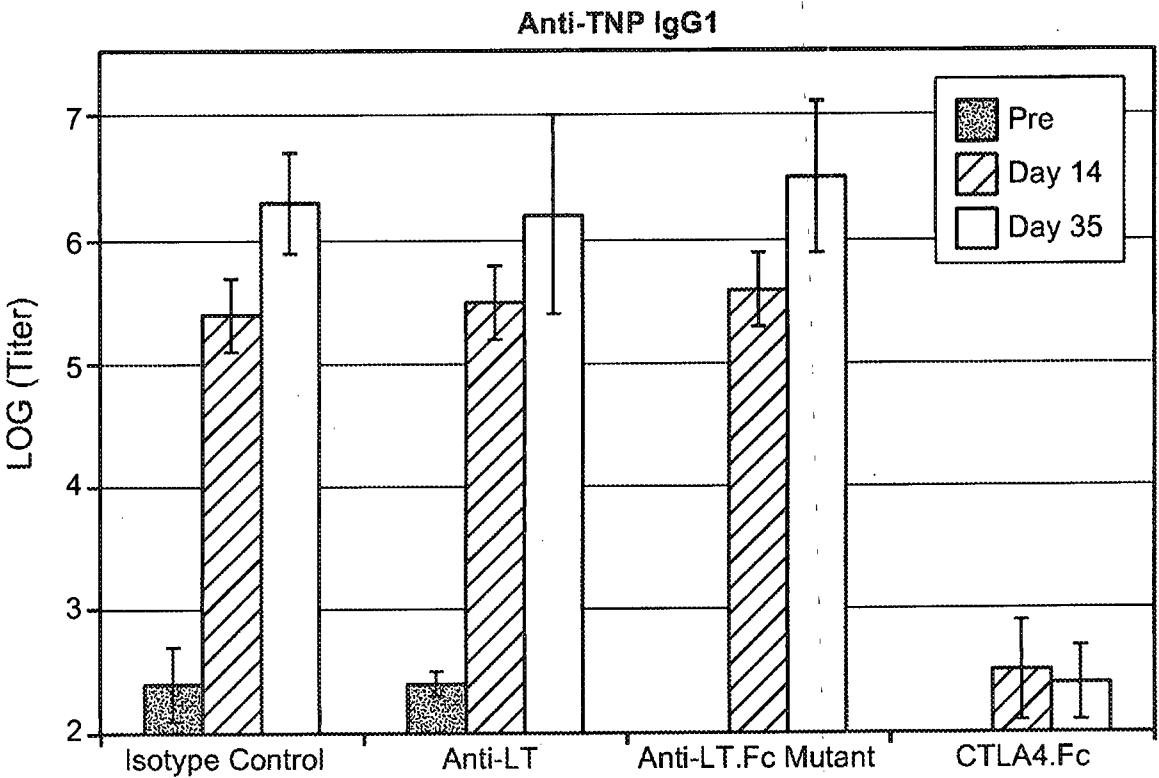


FIG. 7B

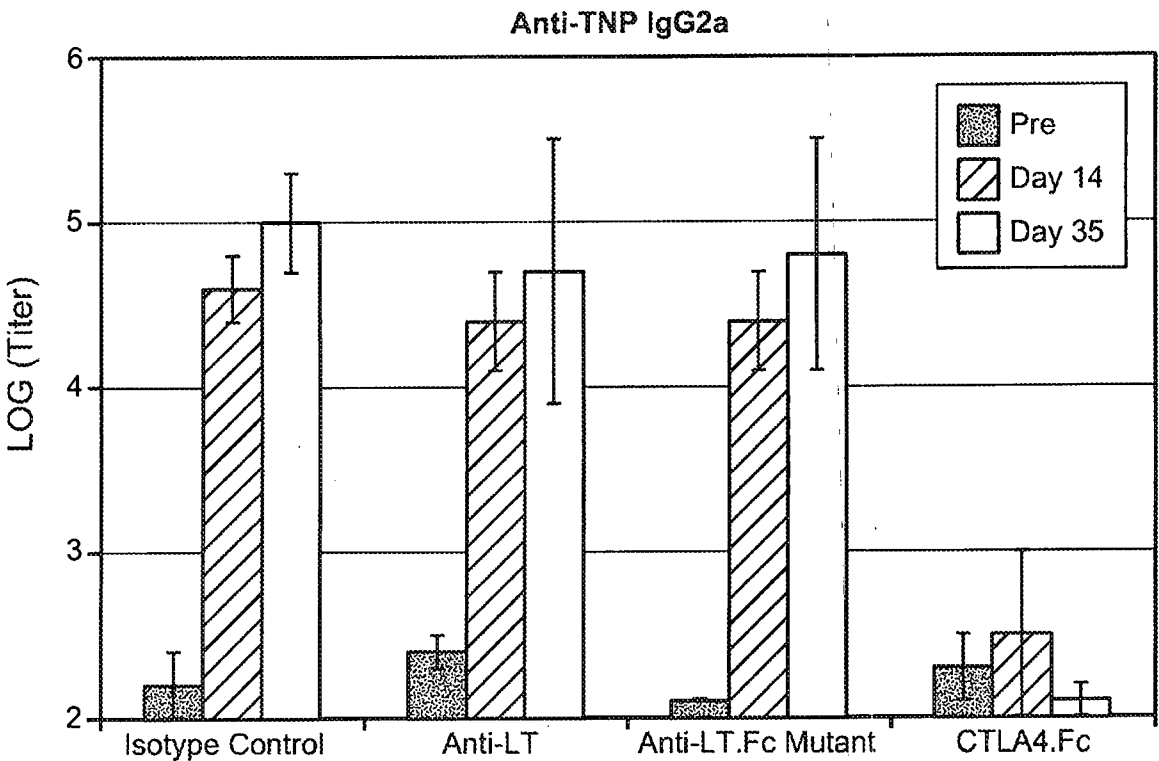


FIG. 7C

10 / 32

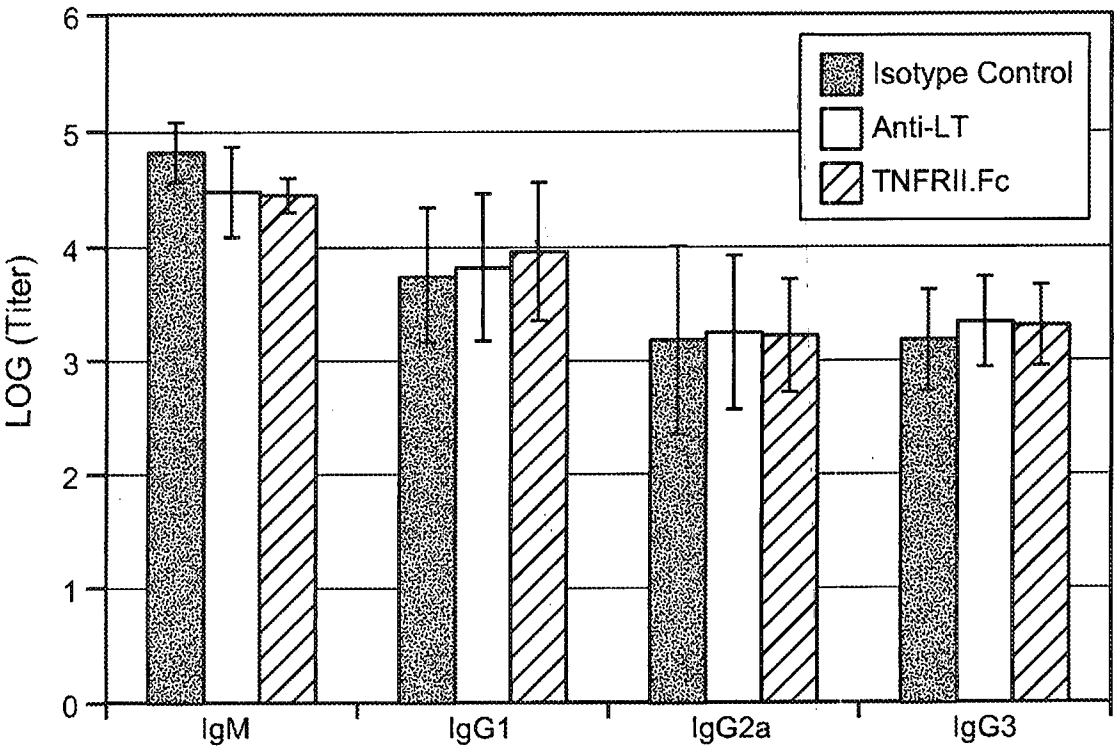


FIG. 8

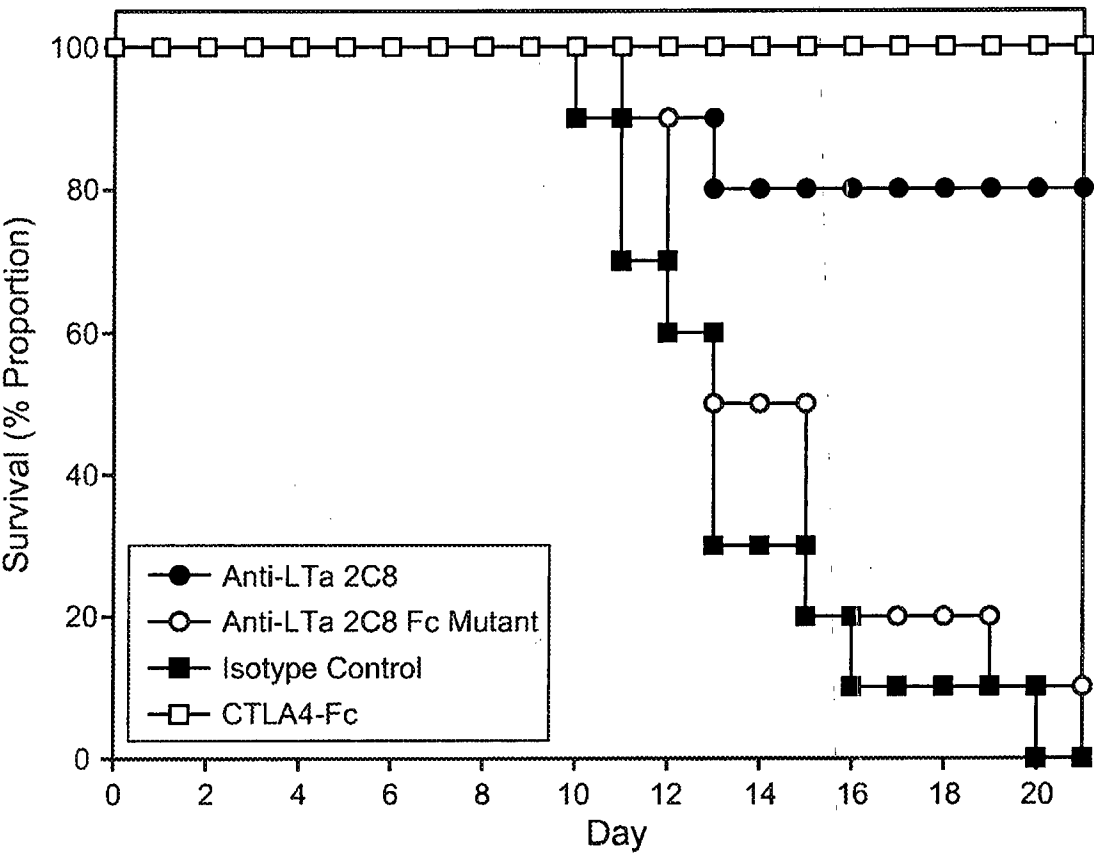
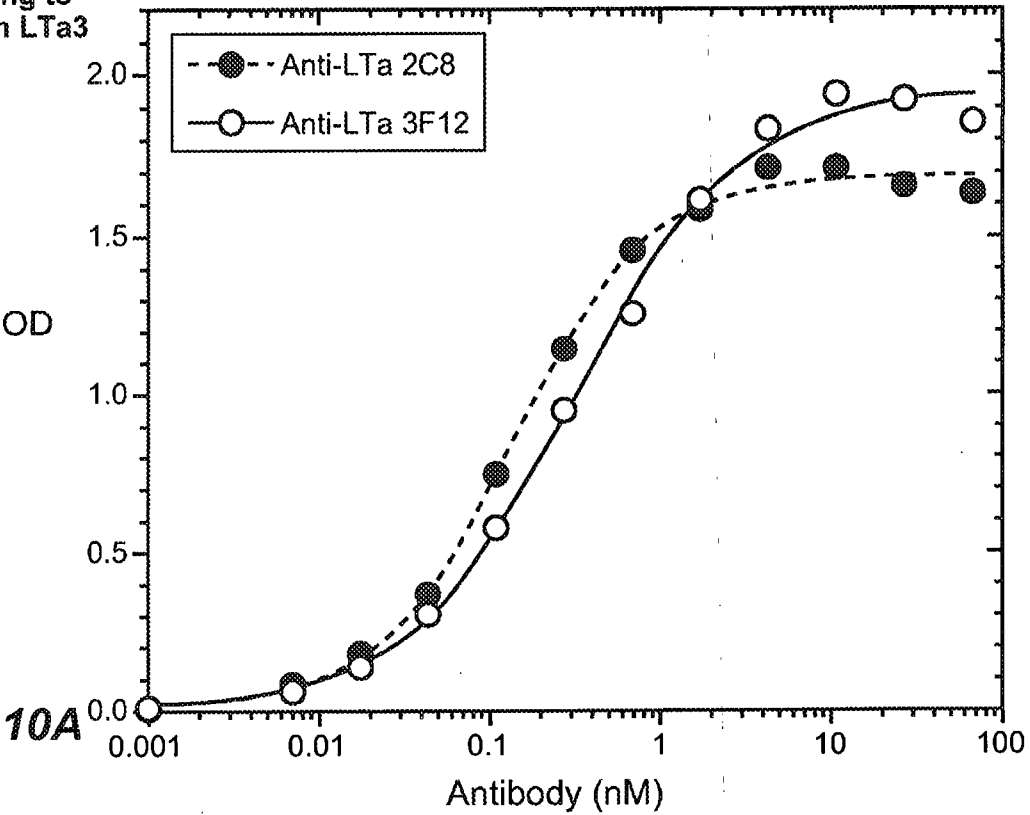


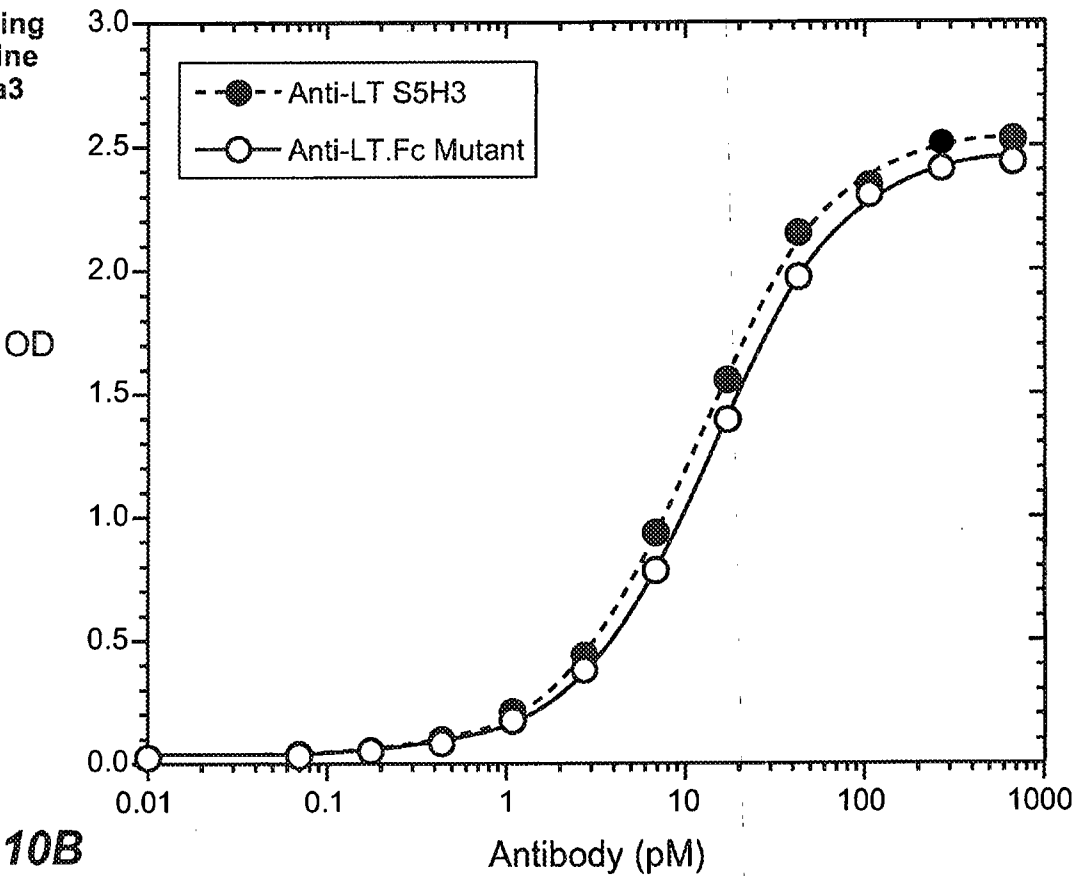
FIG. 9

11 / 32

Binding to Human LTa3



Binding Murine LTa3



12 / 32

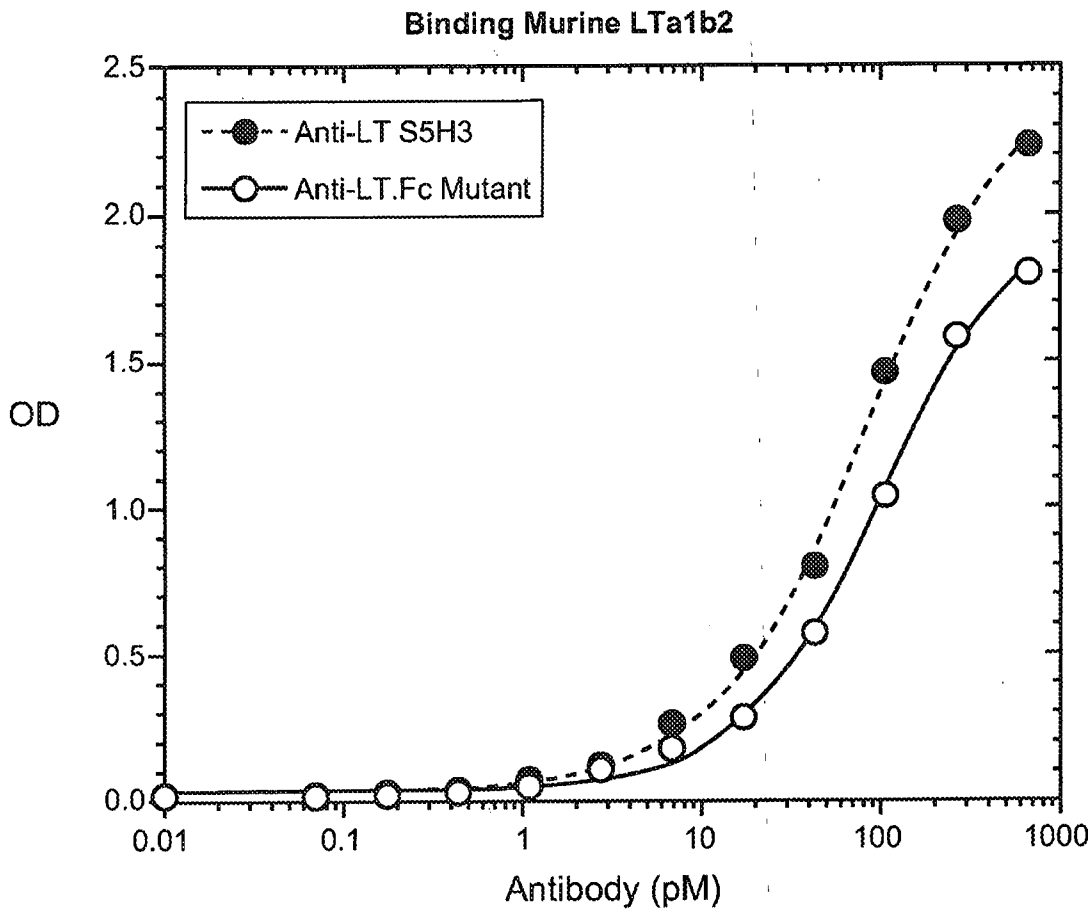
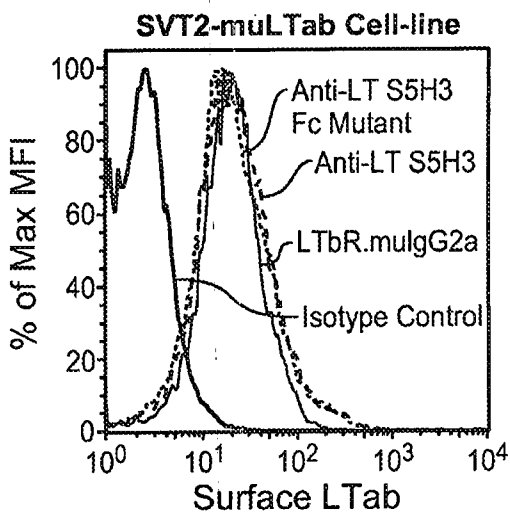
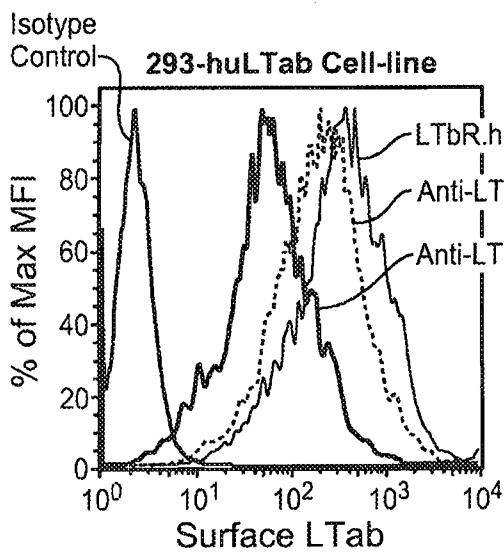


FIG. 11A



13 / 32

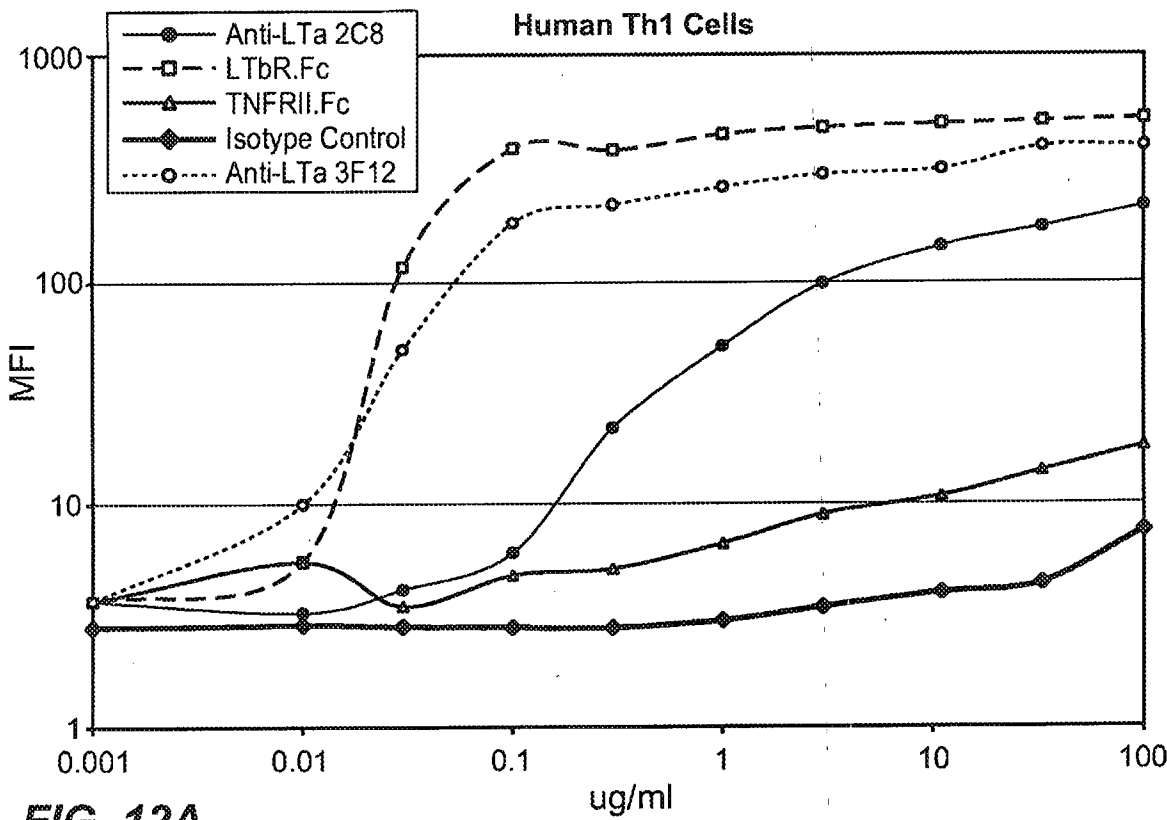


FIG. 12A

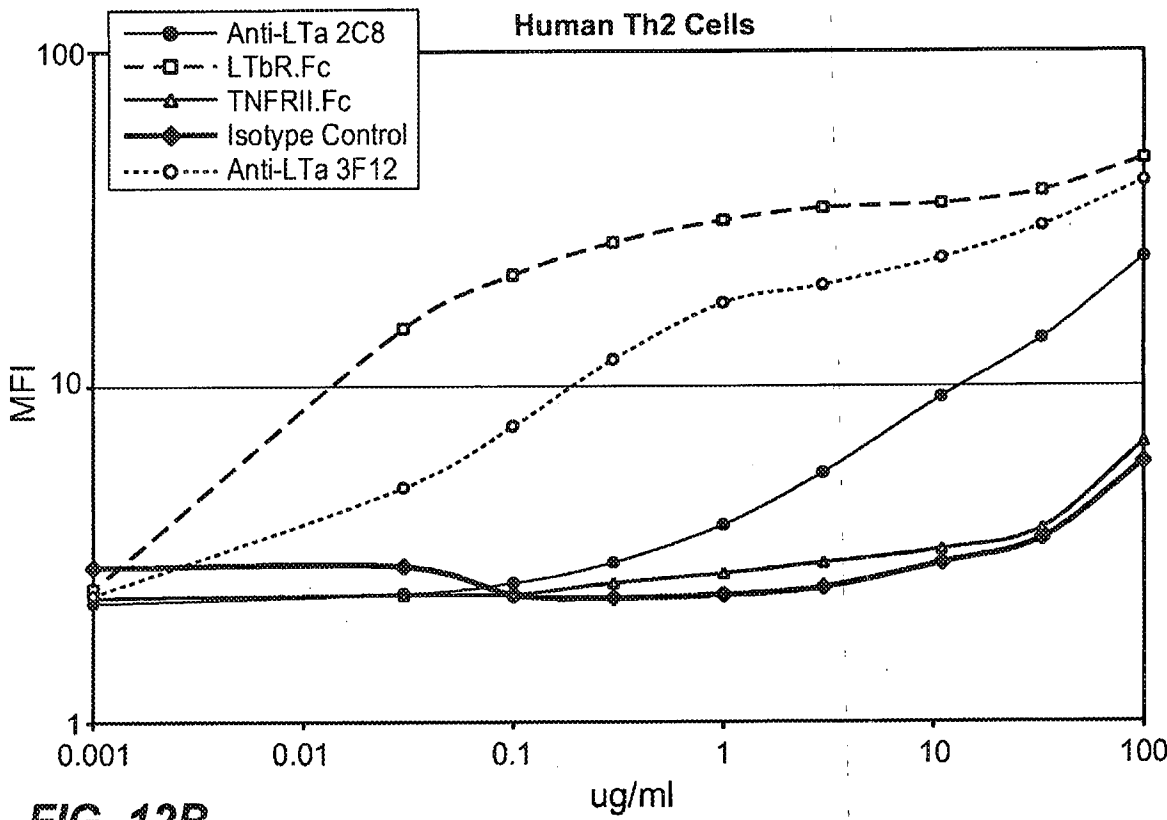


FIG. 12B

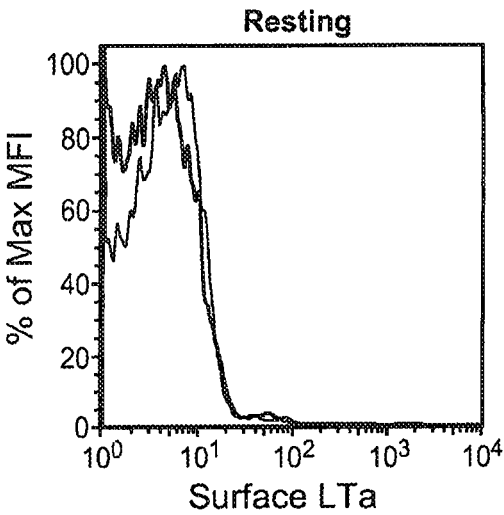


FIG. 12C

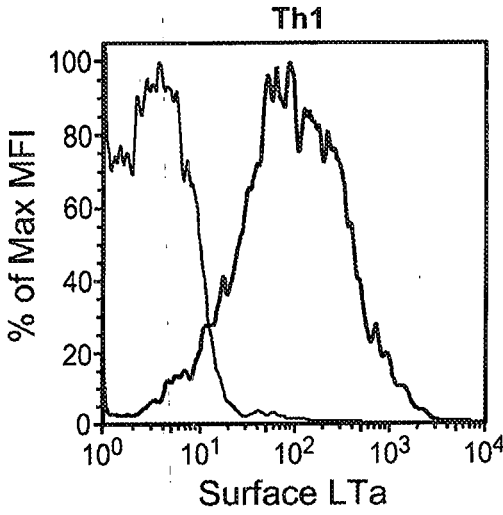


FIG. 12D

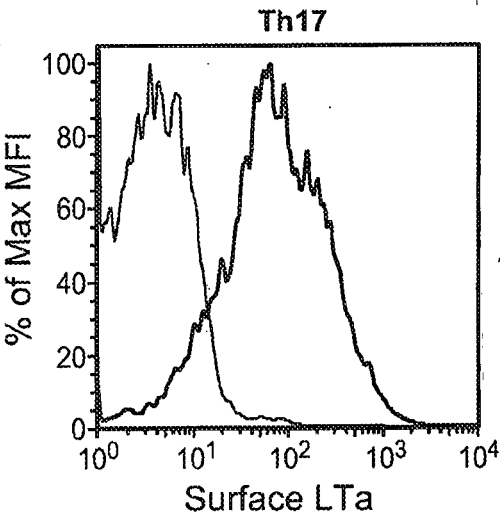


FIG. 12E

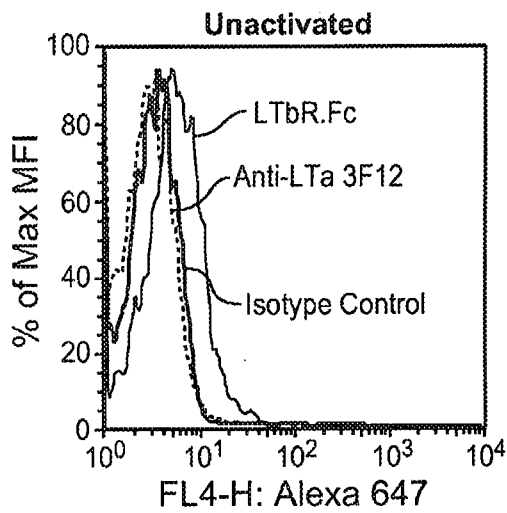


FIG. 13A

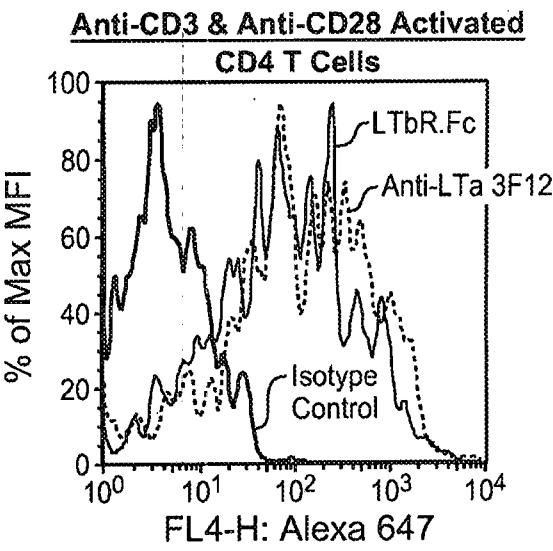


FIG. 13B

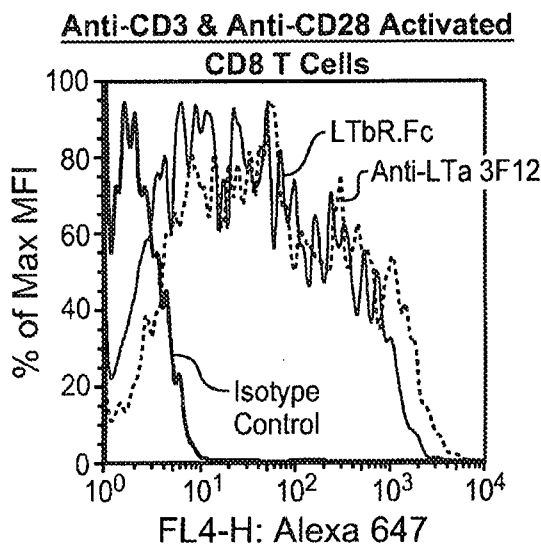


FIG. 13C

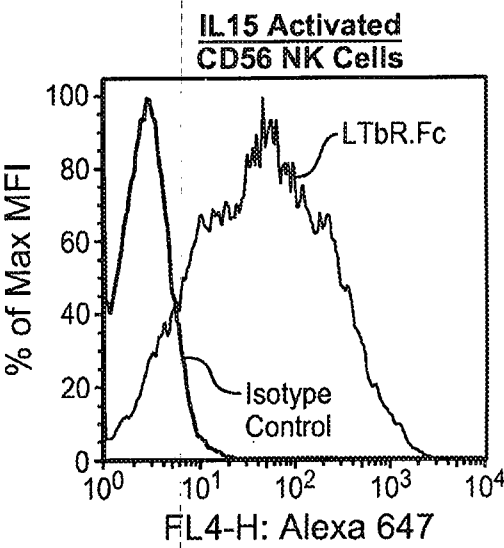


FIG. 13D

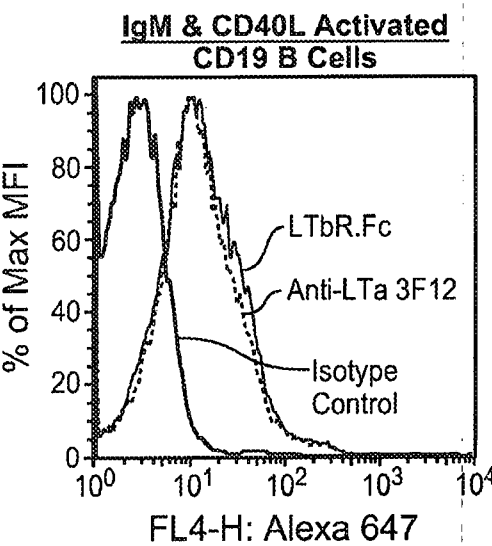


FIG. 13E

16 / 32

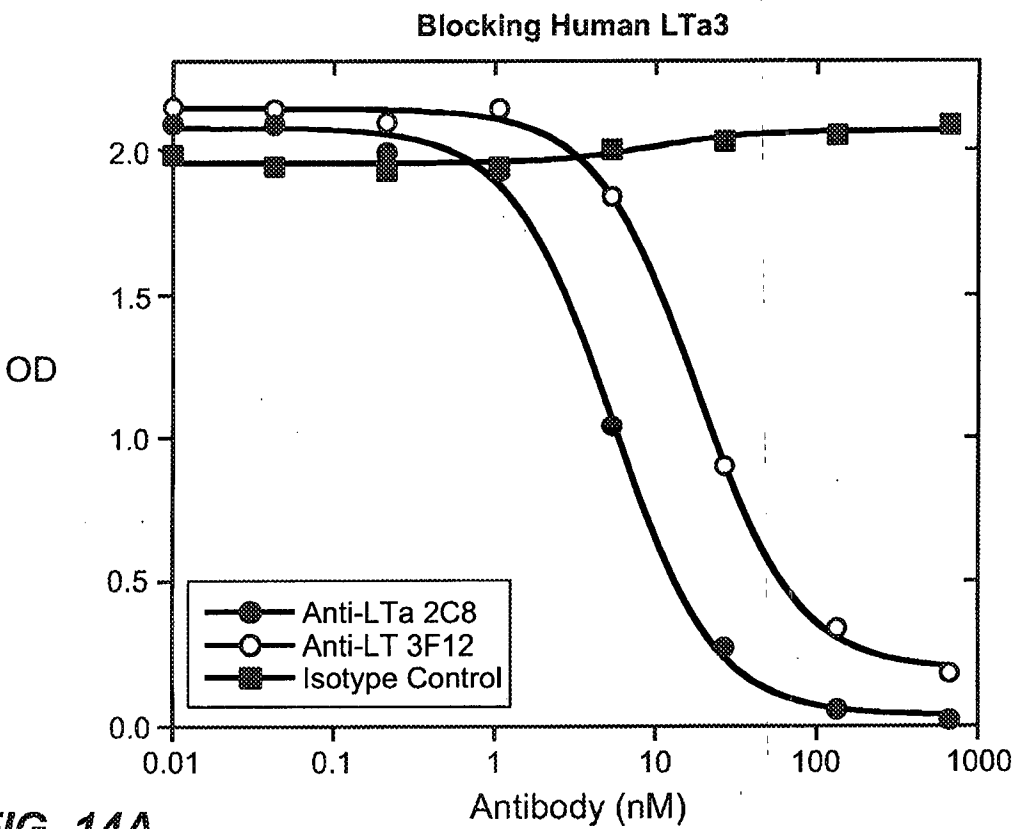


FIG. 14A

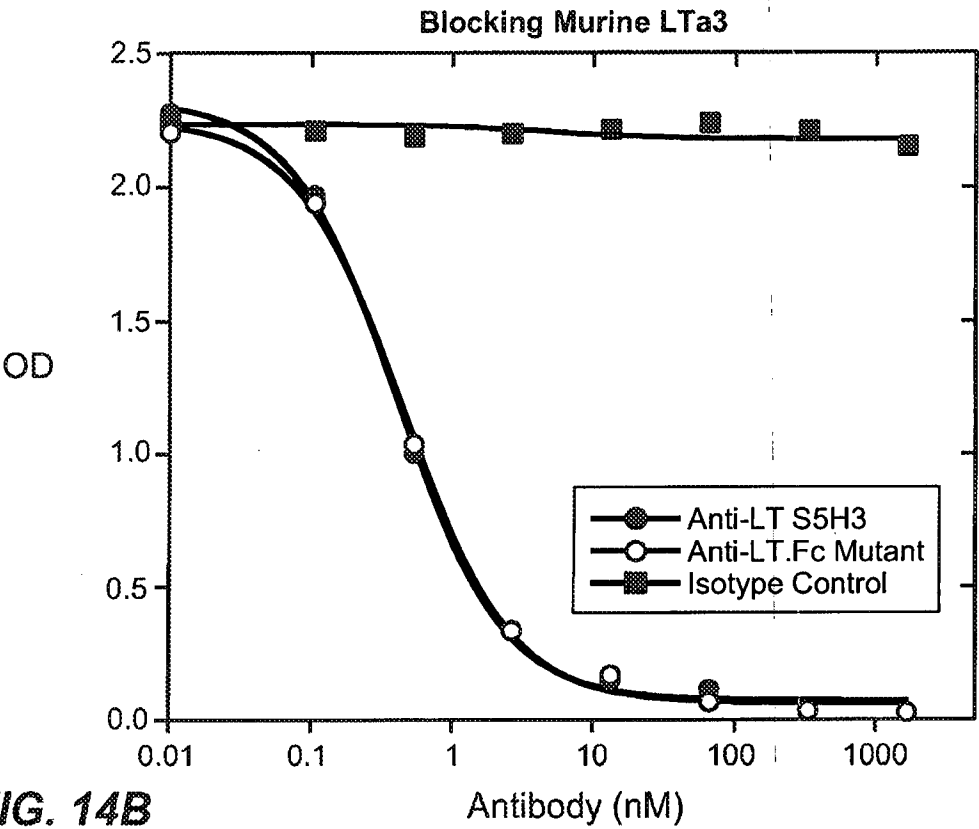


FIG. 14B

17 / 32

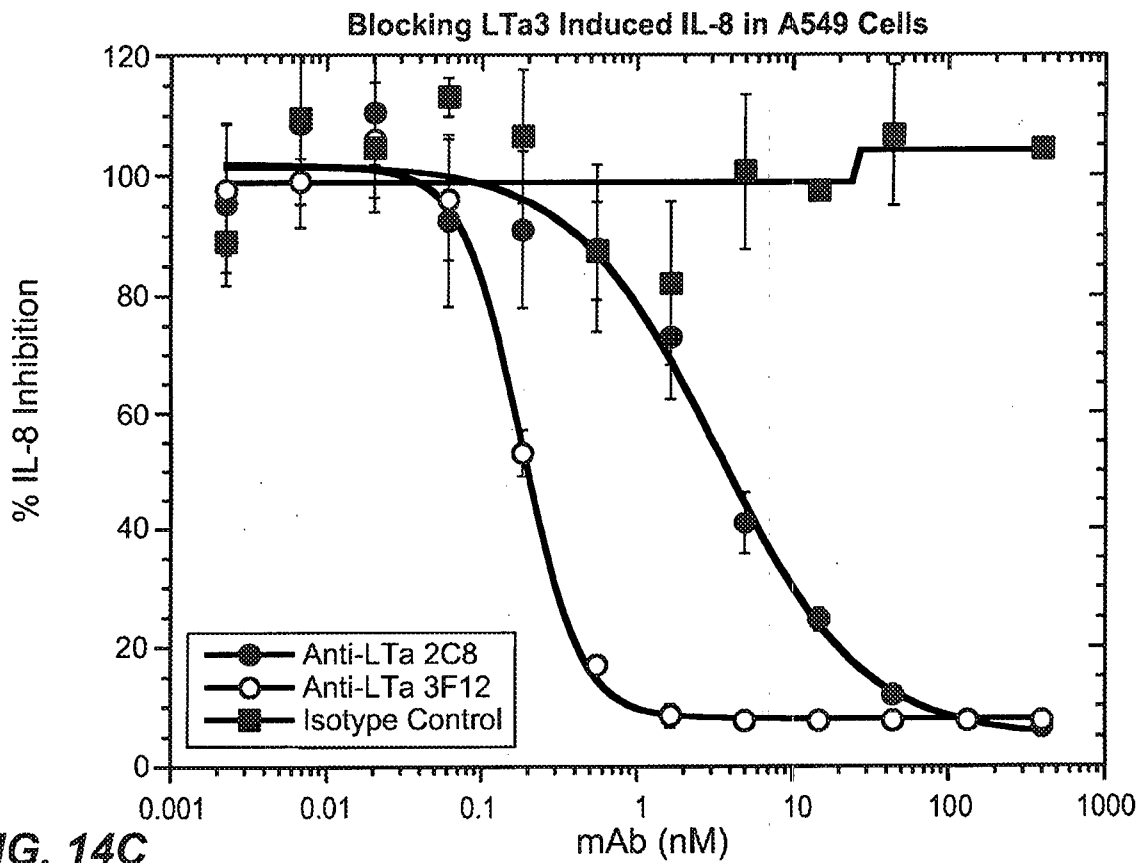


FIG. 14C

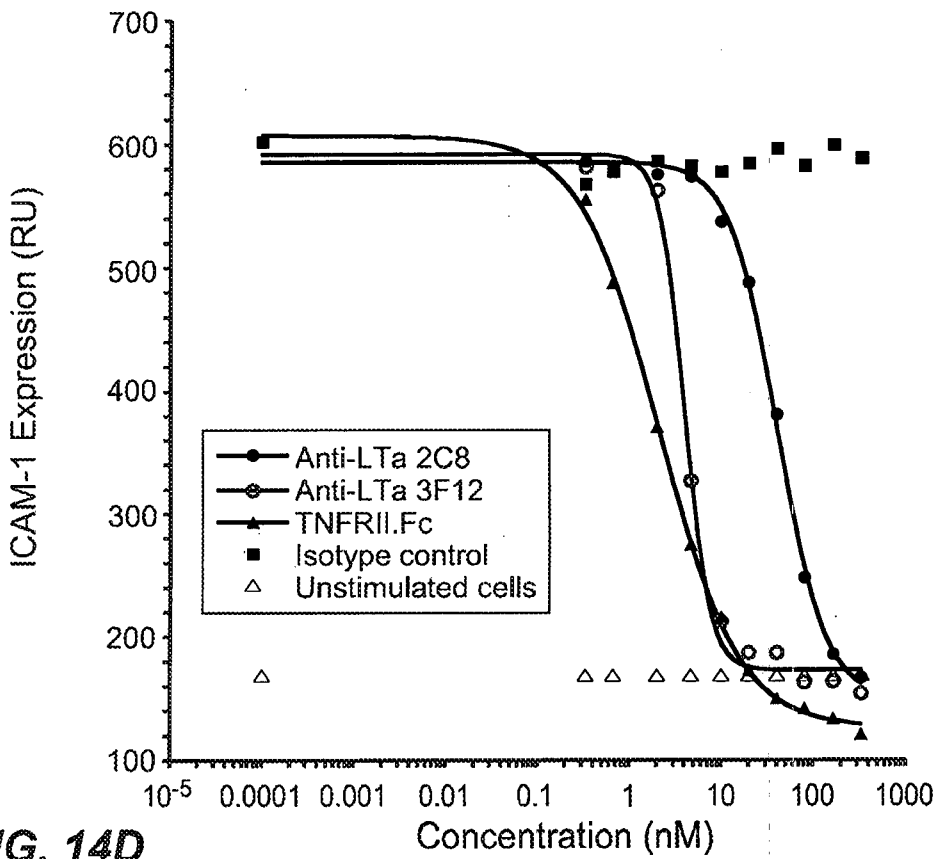


FIG. 14D

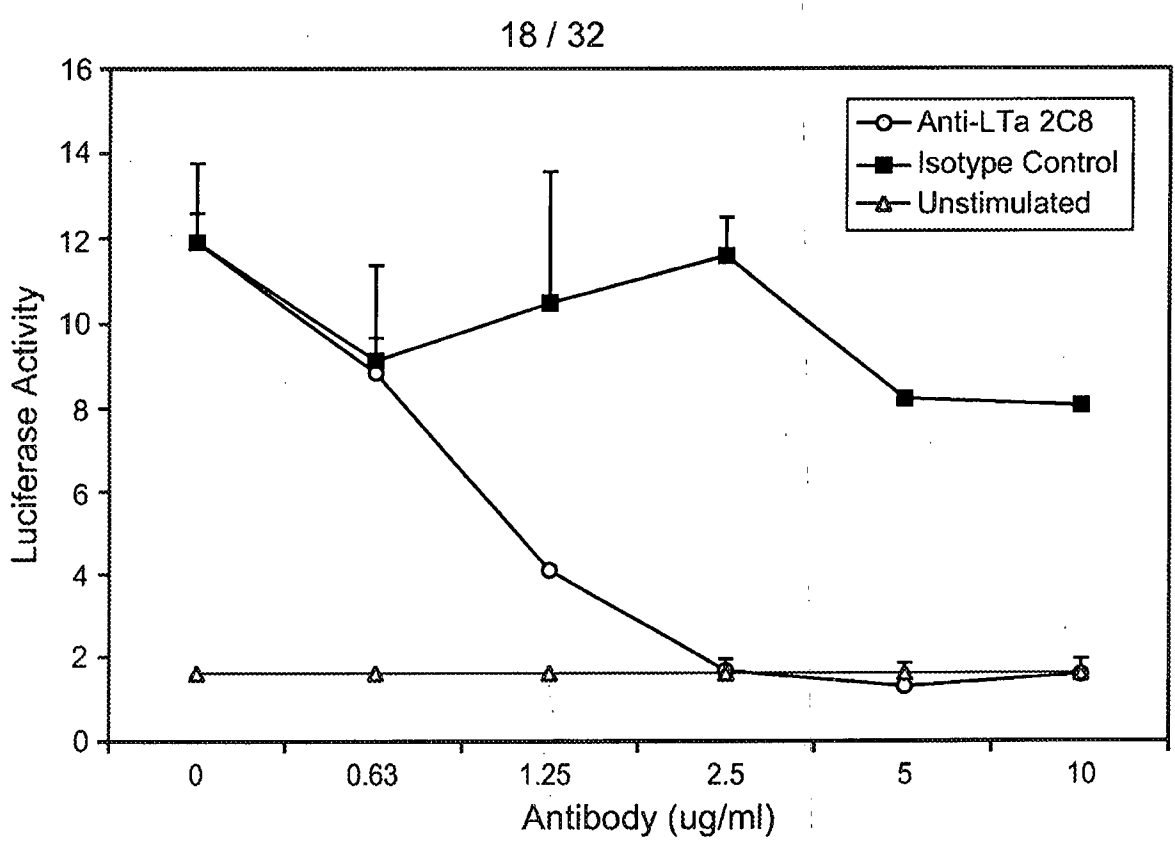


FIG. 14E

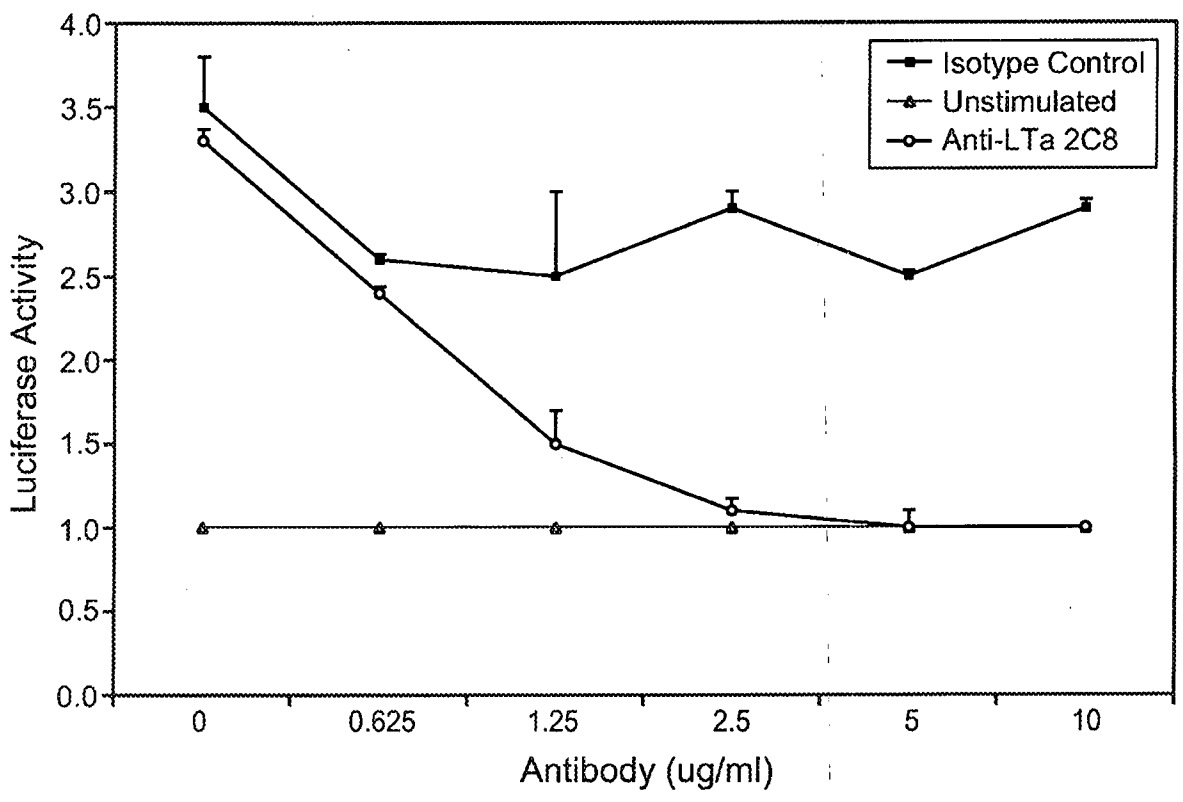


FIG. 15A

19 / 32

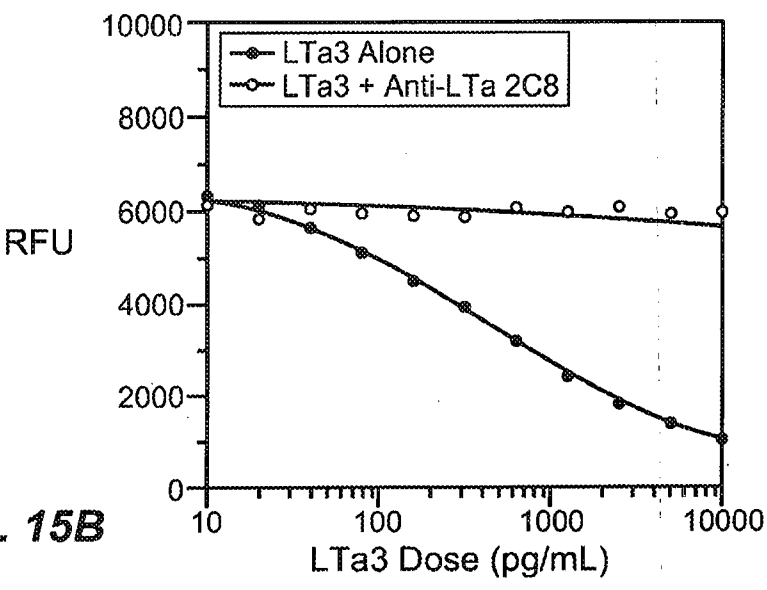


FIG. 15B

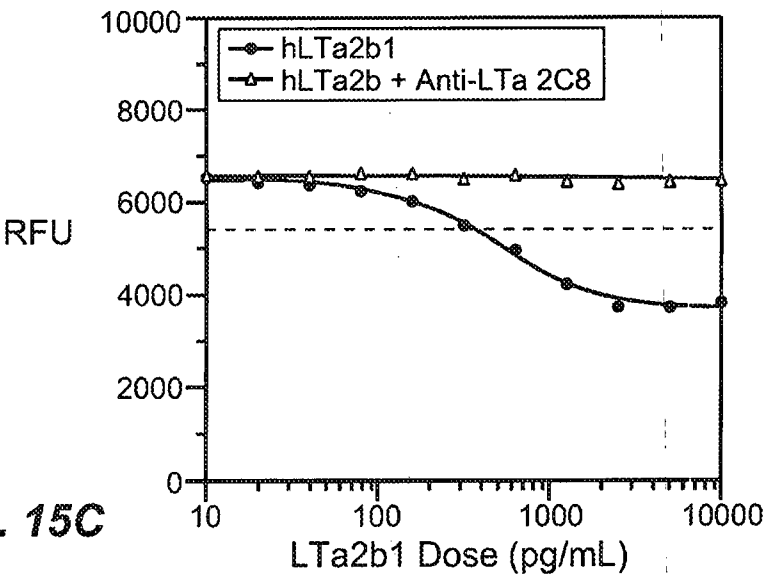


FIG. 15C

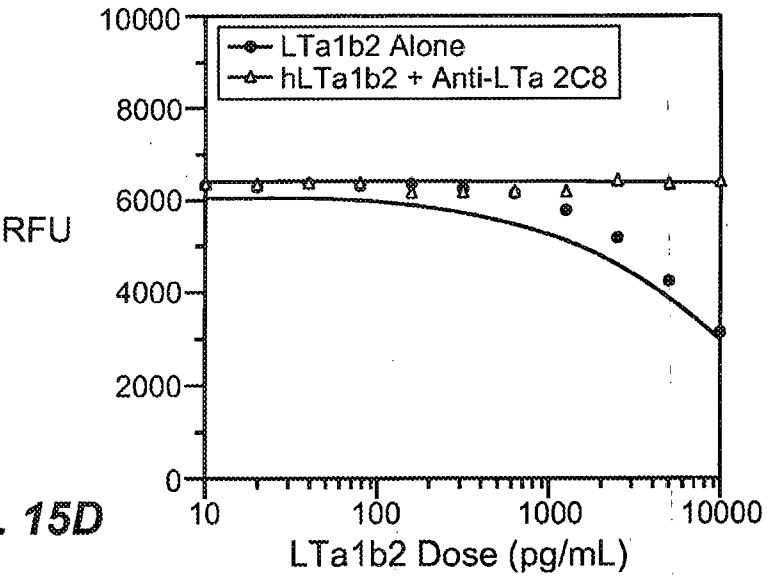


FIG. 15D

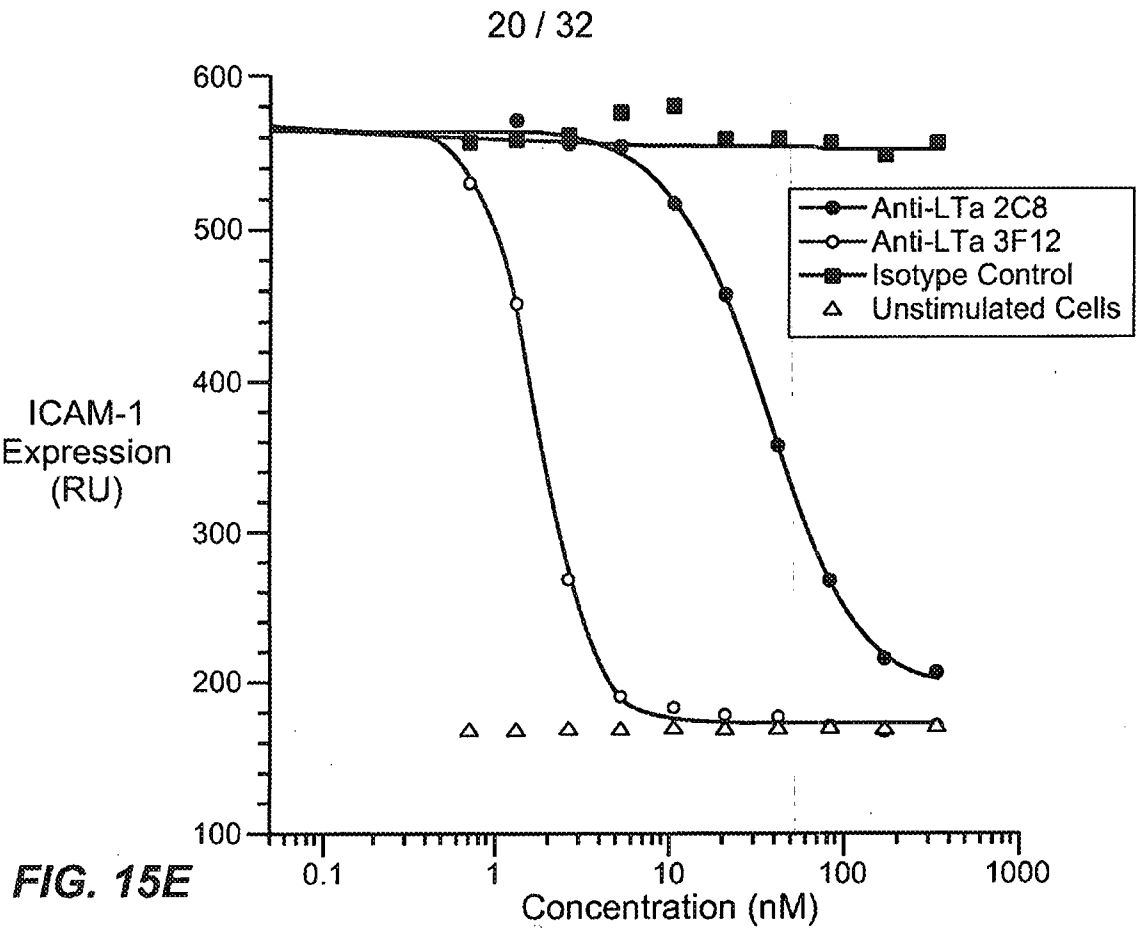


FIG. 15E

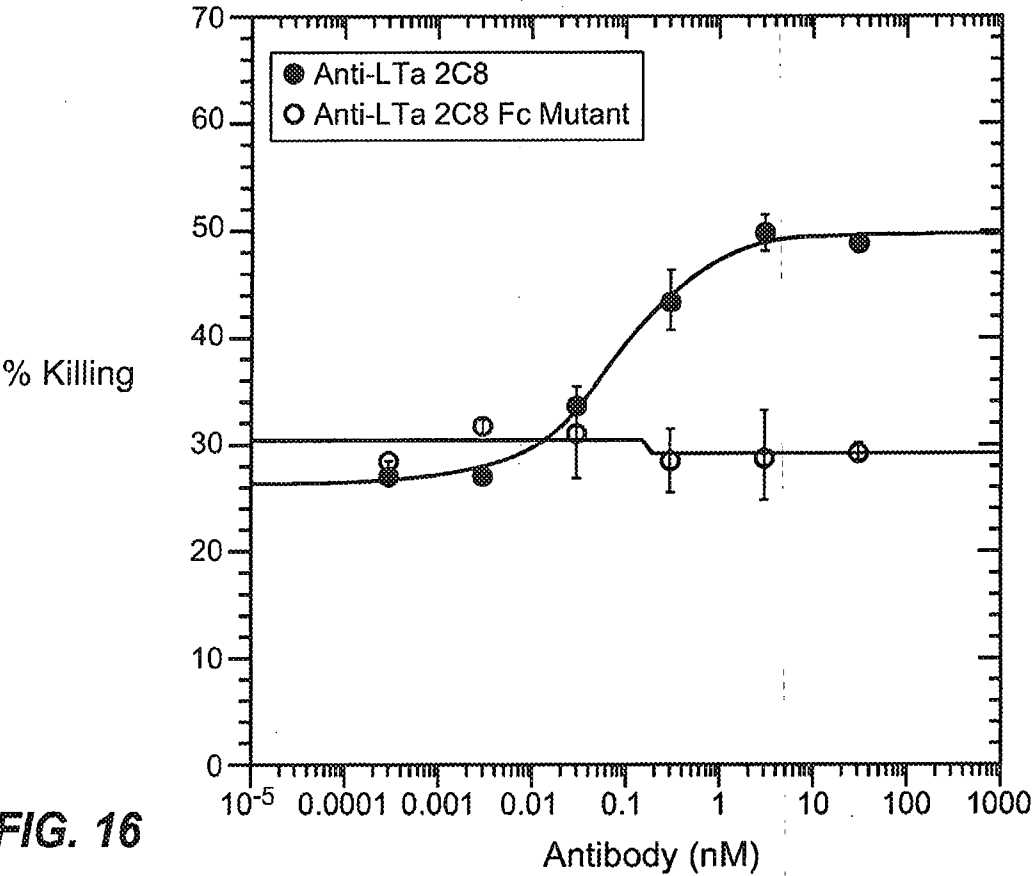


FIG. 16

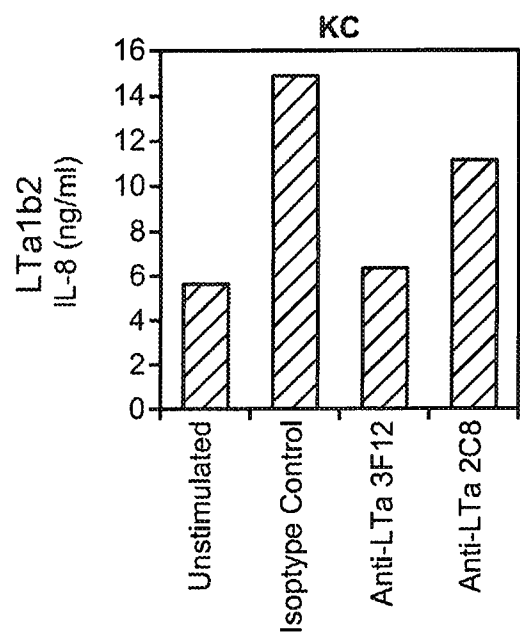


FIG. 17A

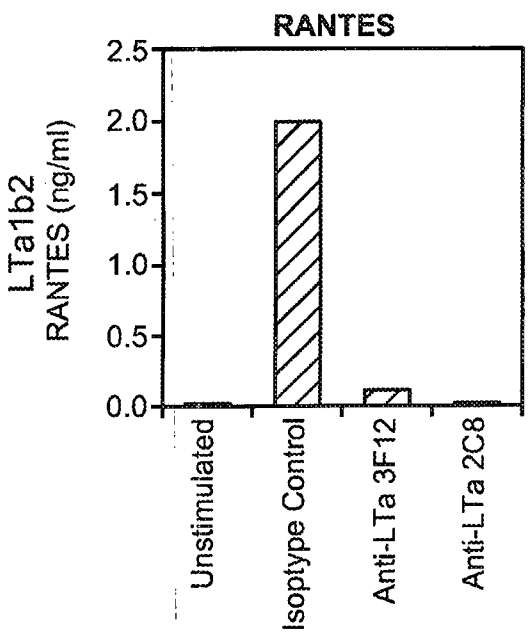


FIG. 17B

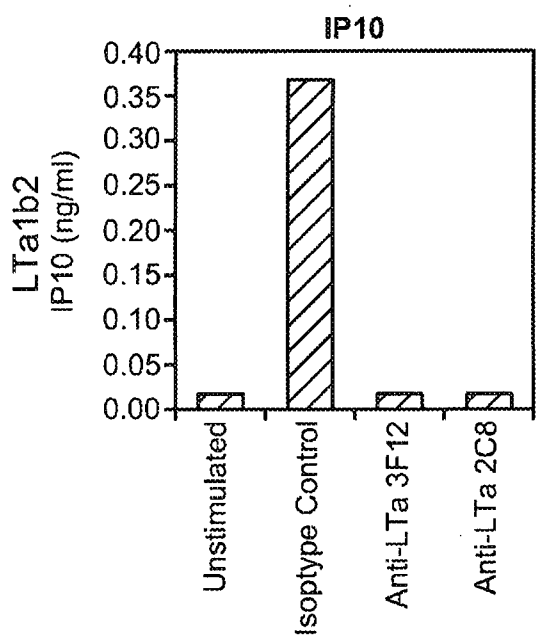


FIG. 17C

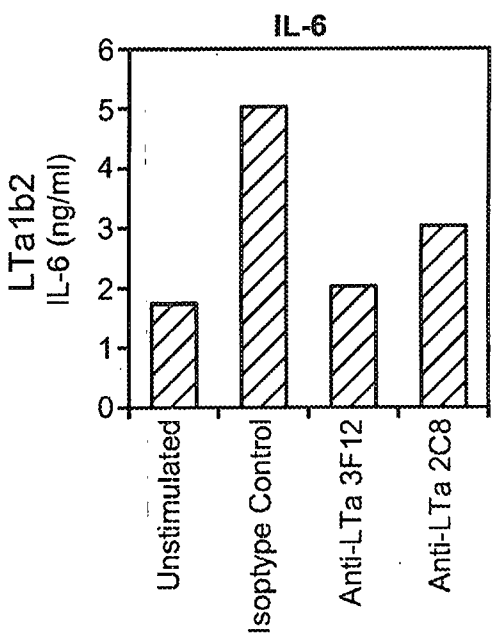


FIG. 17D

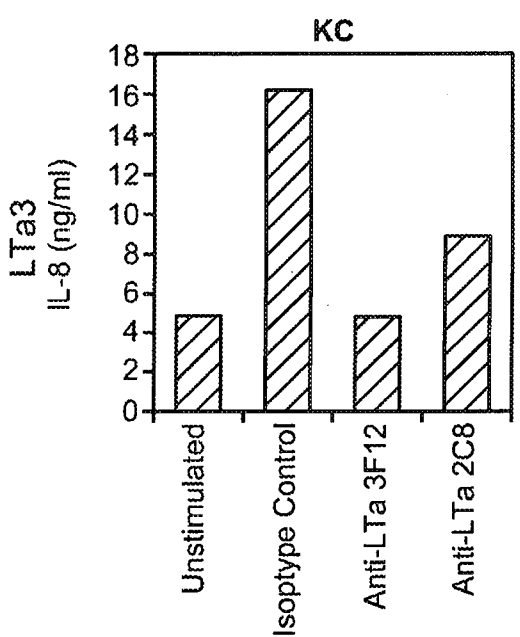


FIG. 17E

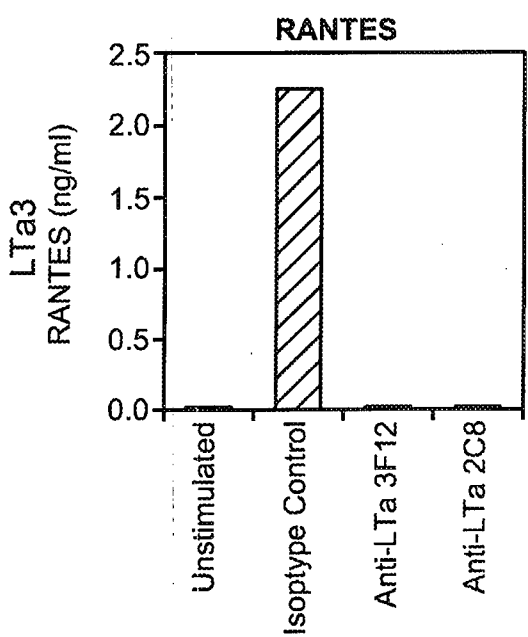


FIG. 17F

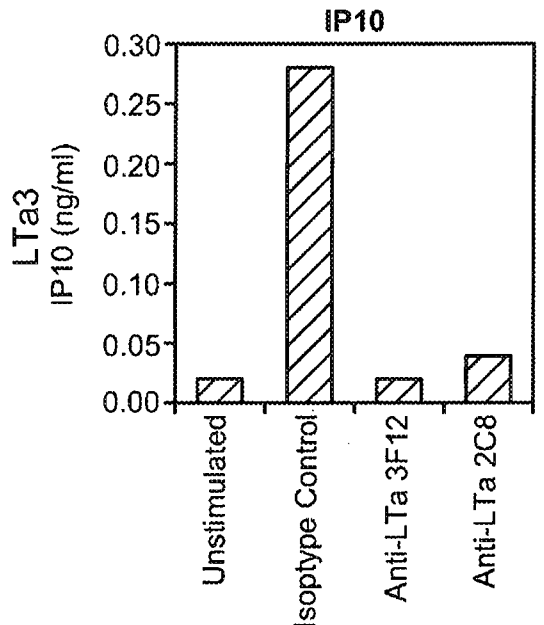


FIG. 17G

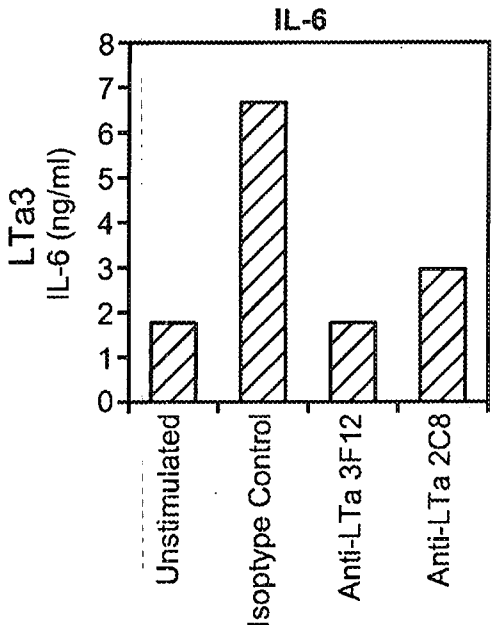


FIG. 17H

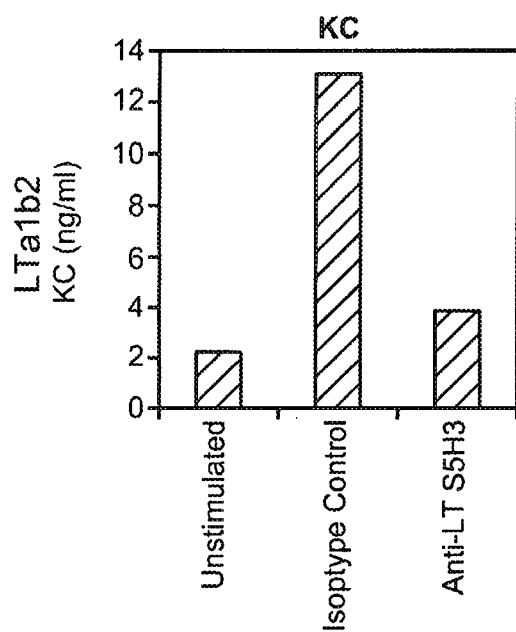


FIG. 17I

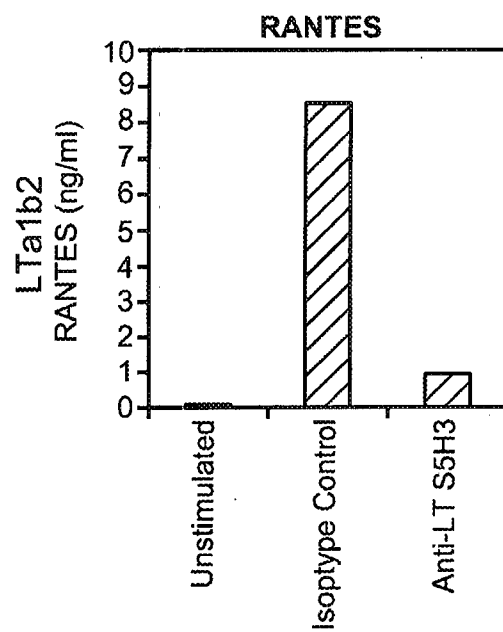


FIG. 17J

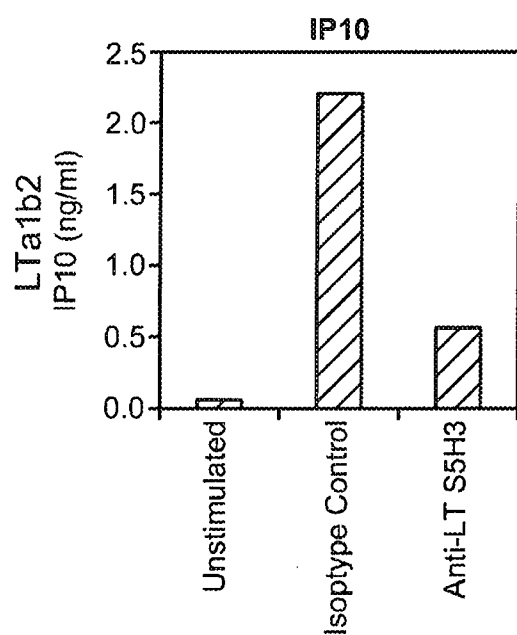


FIG. 17K

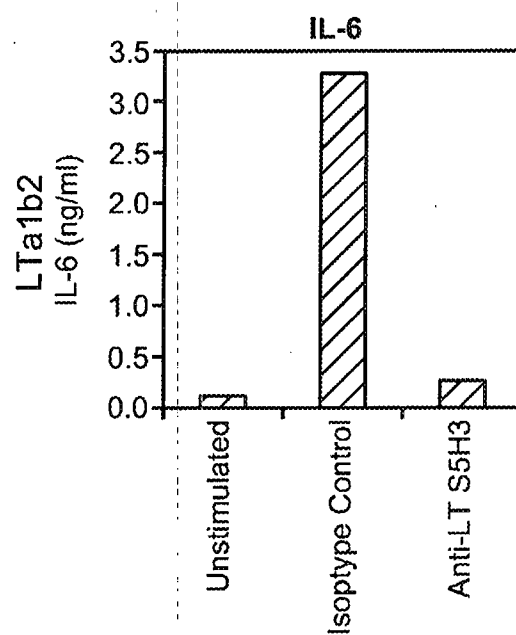


FIG. 17L

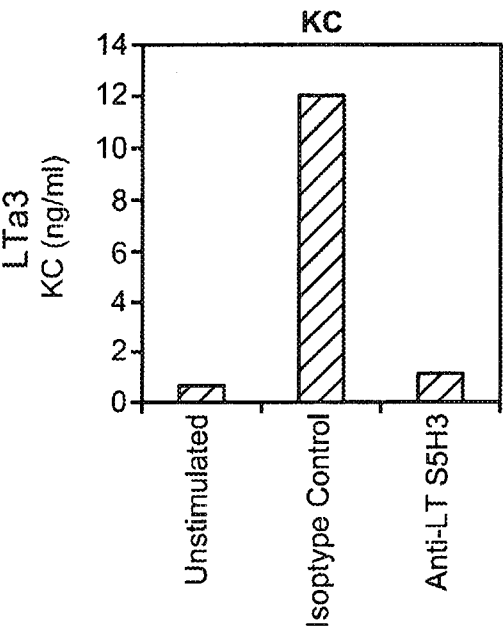


FIG. 17M

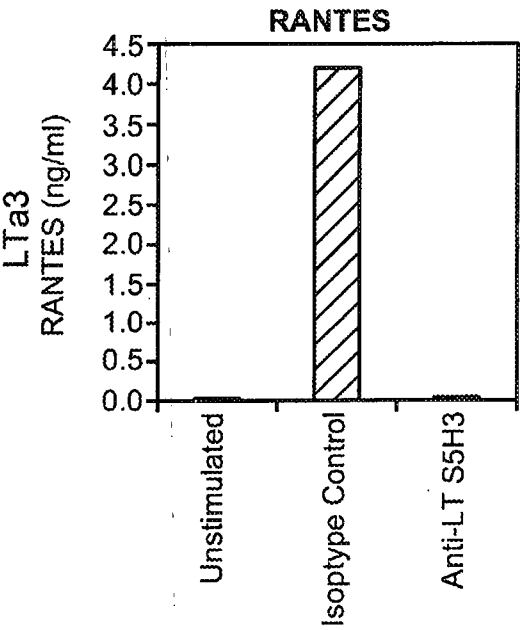


FIG. 17N

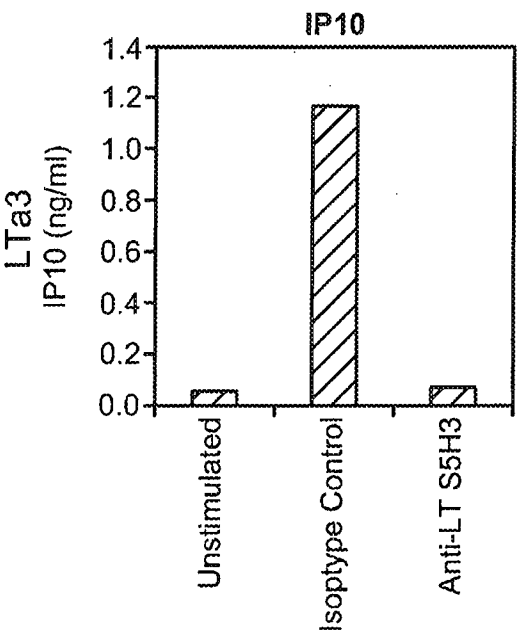


FIG. 17O

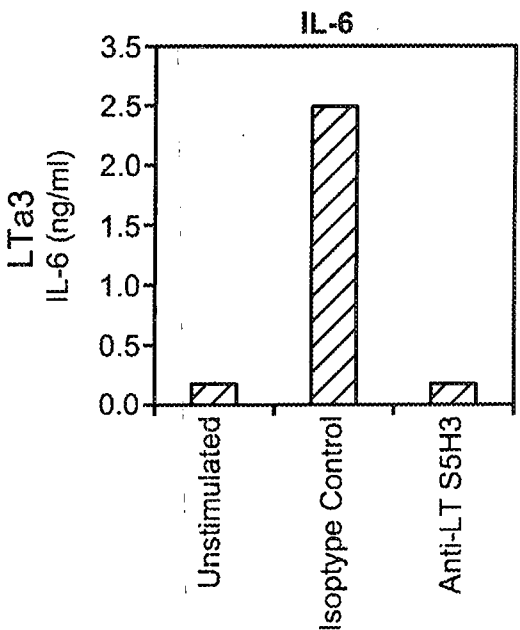


FIG. 17P

25 / 32

Variable Light Domain

	10	20	30	40
chim.2C8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	[KASQAVSSAVA]	WYQQKP	
	* * * * *	*	*	
hu2C8.vX	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQAVSSAVA]	WYQQKP	
		* * * * *		
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISINYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
chim.2C8	GQSPKLQIY [SASHRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	* *	
hu2C8.vX	GKAPKLLIY [SASHRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* * * * *			
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
chim.2C8	EDLAVYYC [QQHYSTPWT]	FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:23)		
	* *	** *		
hu2C8.vX	EDFATYYC [QESYSTPWT]	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:102)		
		* * * *		
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:40)		

FIG. 18A

Variable Heavy Domain

	10	20	30	
chim.2C8	EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKAS	[GYTFTSYVIH]	WVKQK	
	** ** *	* * *	*	
hu2C8.vX	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYVIH]	WVRQA	
		* * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
chim.2C8	PGQGLEWIG [YNNPYNDGTNYNEKFKG]	KATLTSDKSSSTAYM		
	* *	*	** ** *	*
hu2C8.vX	PGKGLEWVG [YNNPYNAGTNYNEKFKG]	RFTISSDKSKNTAYL		
	* * * * * *	* * *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
chim.2C8	ELSSLTSEDSAVYYCSR [PTMLPWF-AY]	WGQGTTLTVSA		
(SEQ ID NO:25)				
	** * *		** *	
hu2C8.vX	QMNSLRAEDTAVYYCSR [PTMLPWF-AY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:103)				
		* * * * * *		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:41)				

FIG. 18B

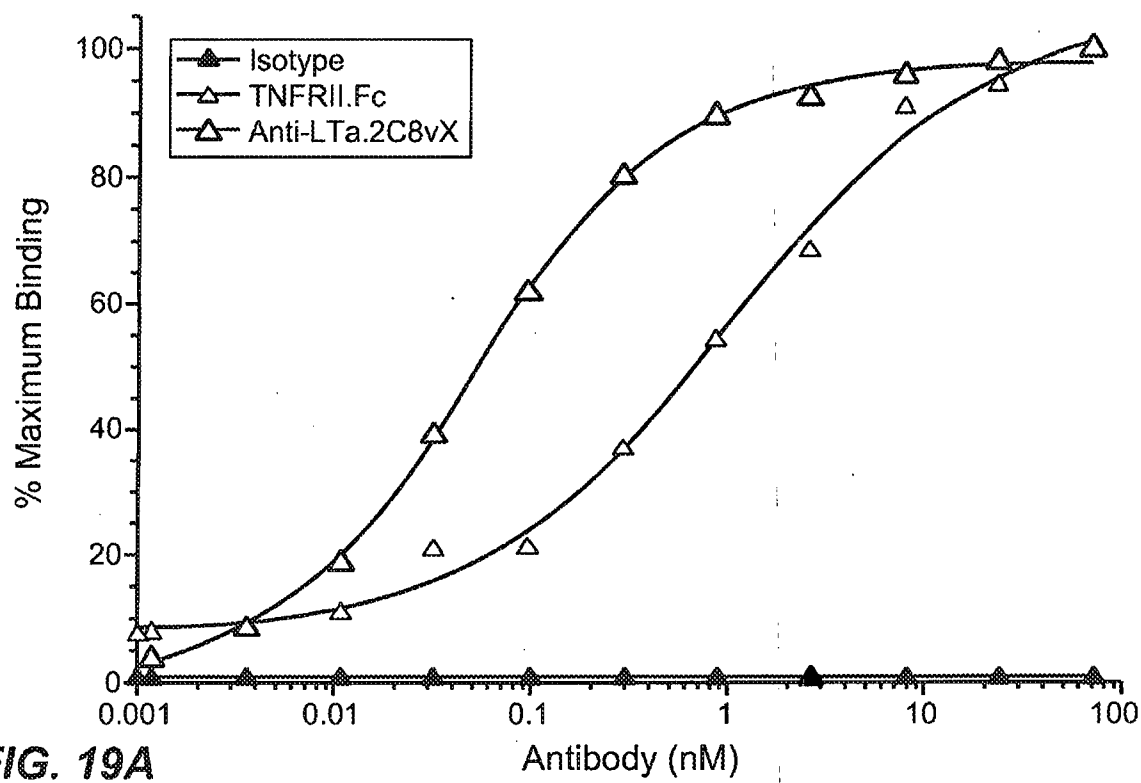


FIG. 19A

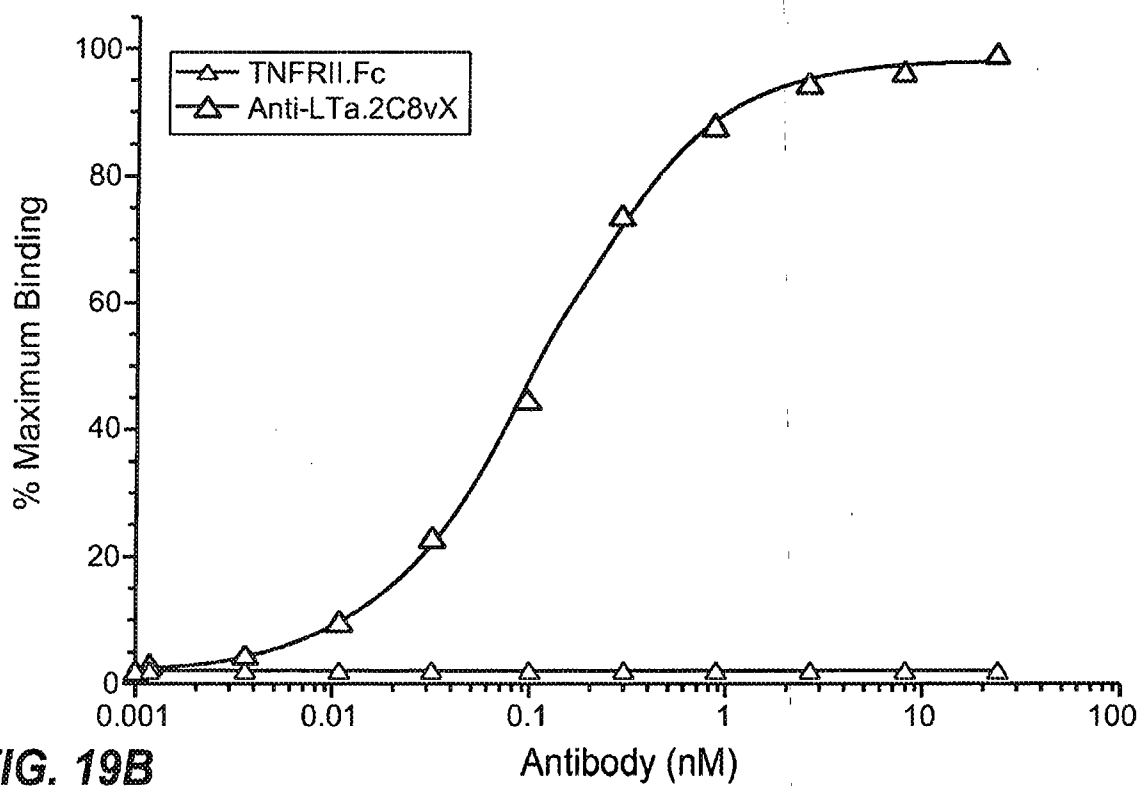


FIG. 19B

27 / 32

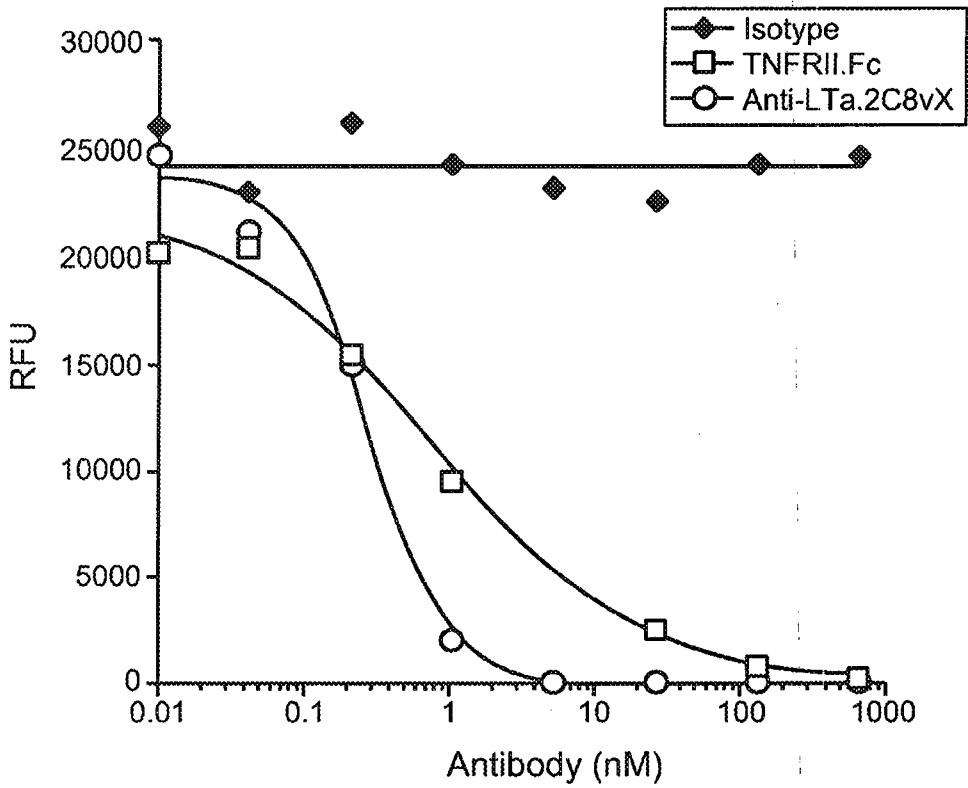


FIG. 20A

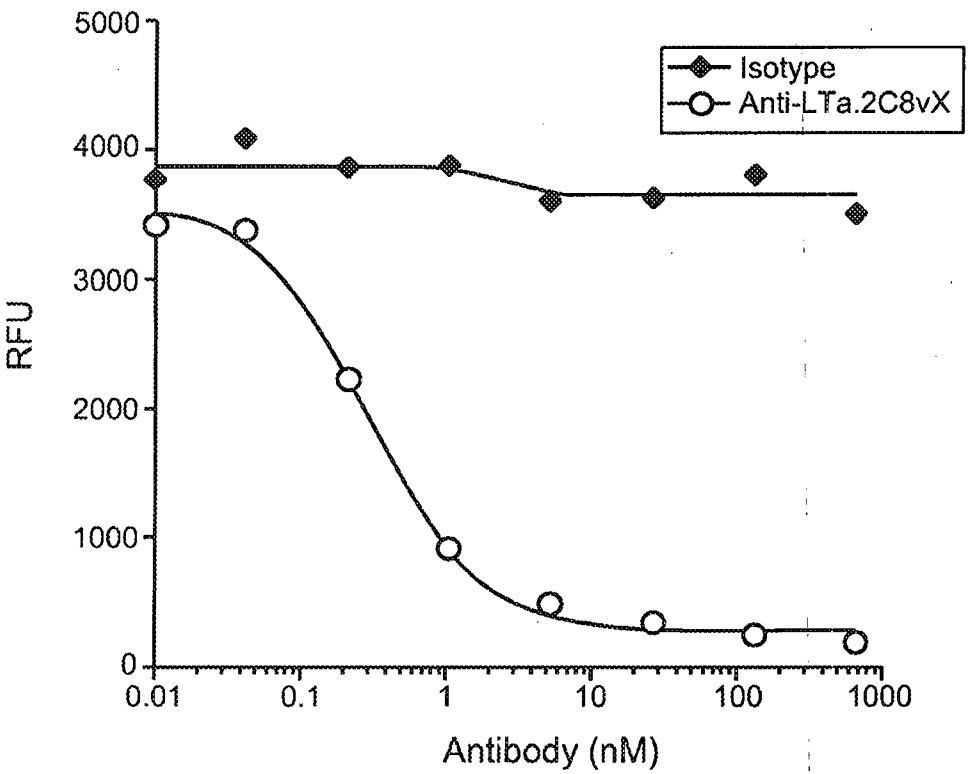


FIG. 20B

28 / 32

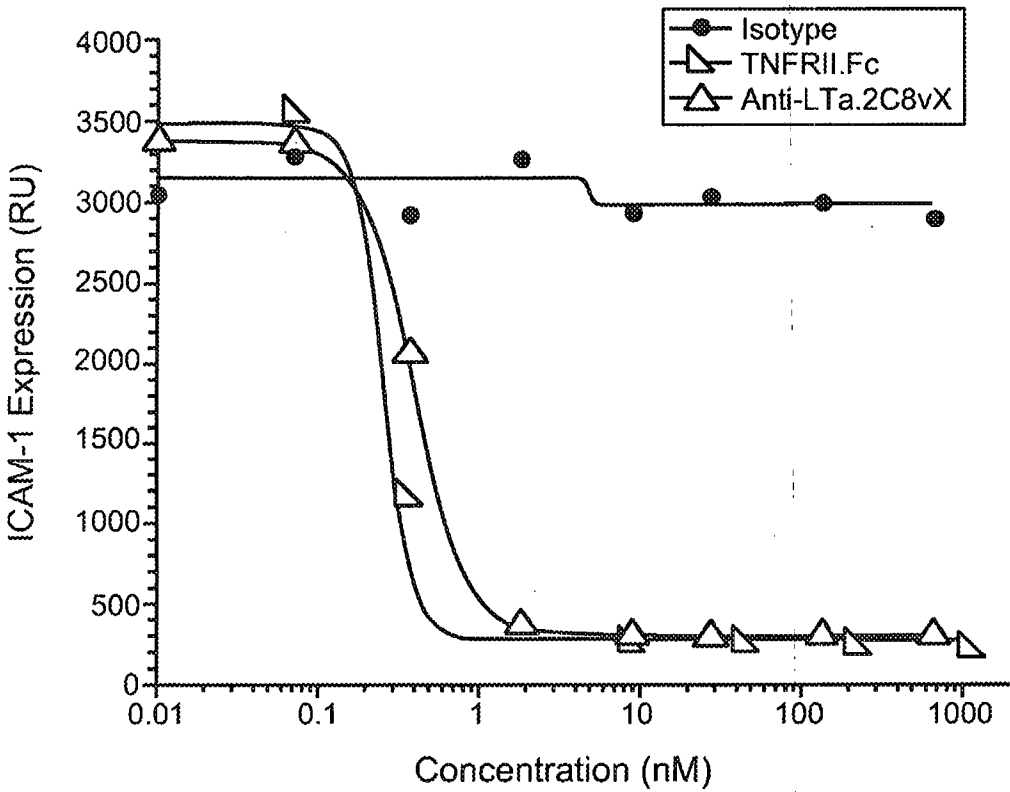


FIG. 21

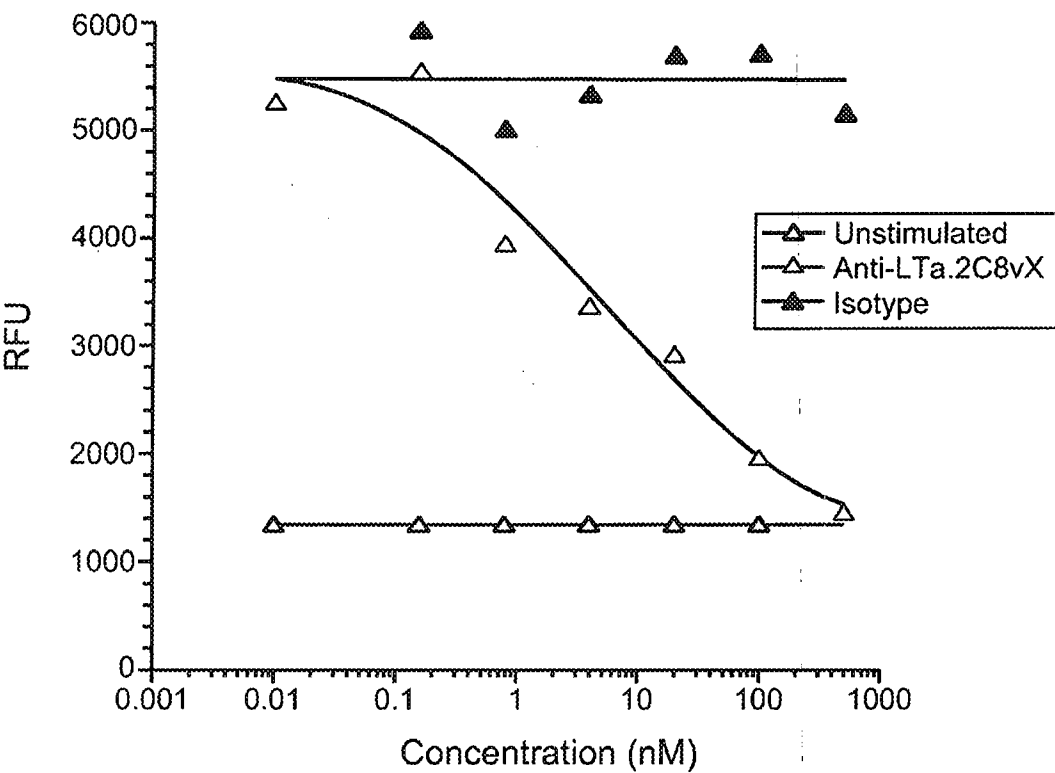


FIG. 22

29 / 32

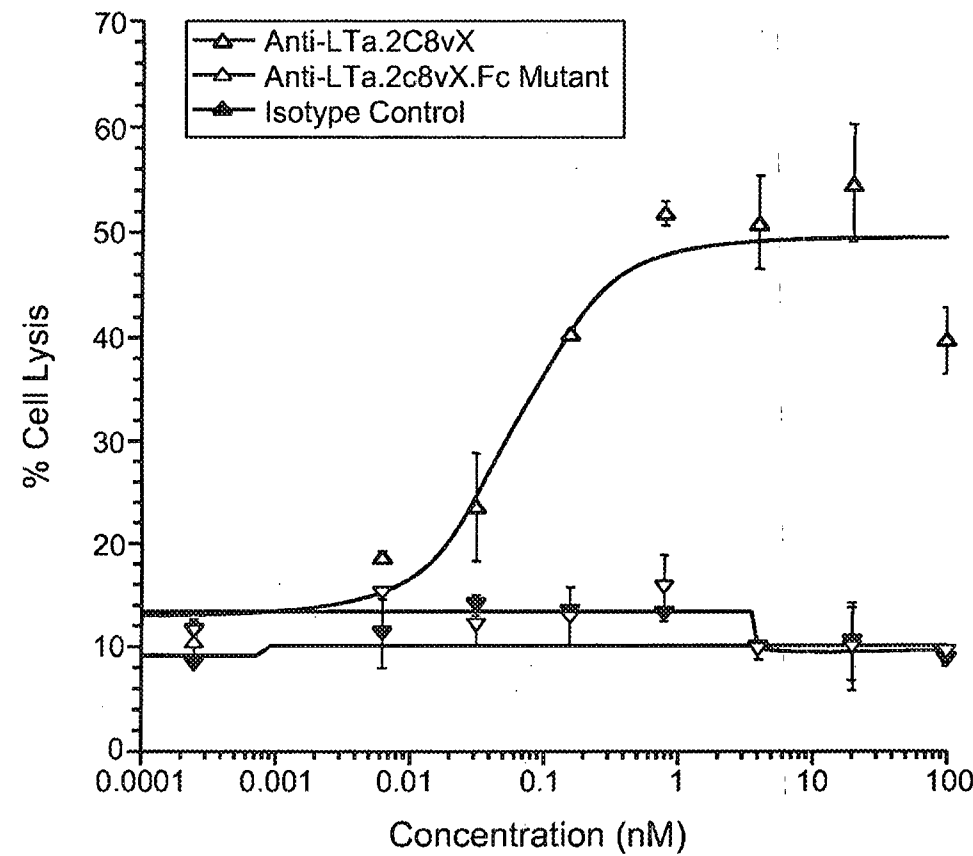


FIG. 23

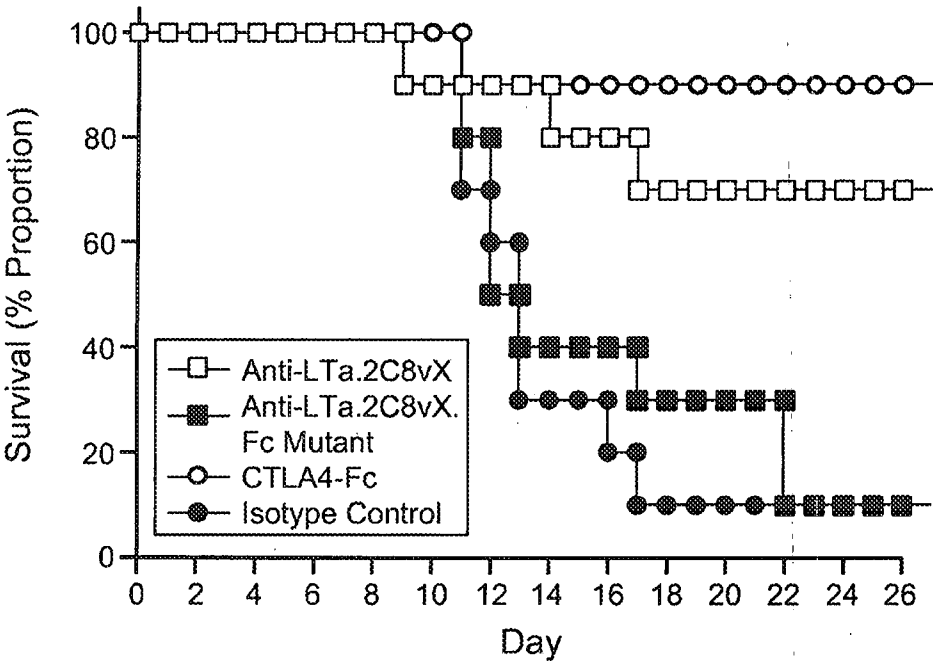


FIG. 24

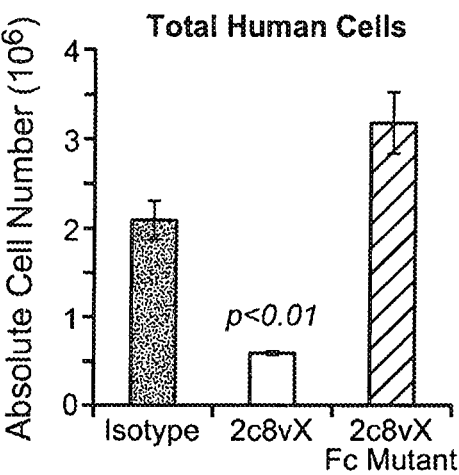


FIG. 25A

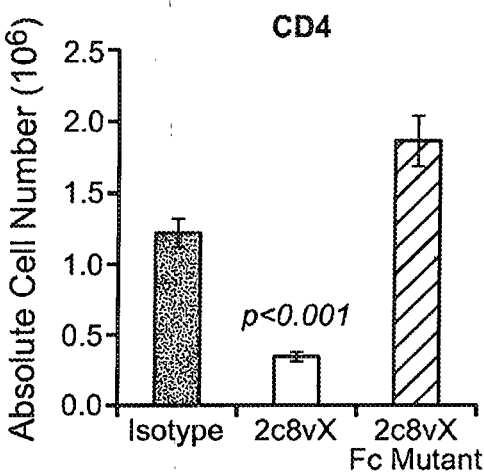


FIG. 25B

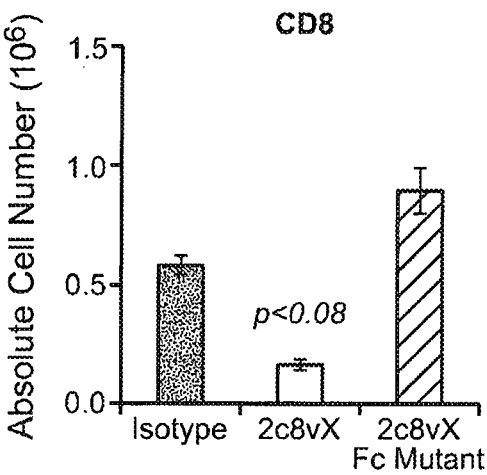


FIG. 25C

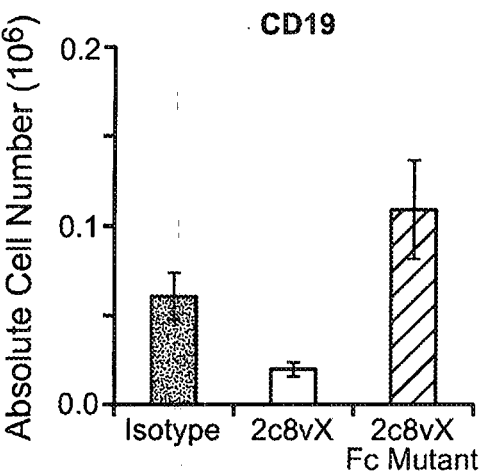


FIG. 25D

31 / 32

Light Chain Variable

	10	20	abcdef	30	
3F12chim	DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQK		
	* *	** ** *			
3F12.v14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQK		
		**			
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[RASQ-----SISNYLA]	WYQQK		
	40	50	60	70	80
3F12chim	PGQSPKLLIY [WASTRDS]	GVPDRFTGSGSGTDFTLT	ISSVKA		
	**		* *		***
3F12.v14	PGKAPKLLIY [WASTRDS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP		
		* ***			
hum kI	PGKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP		
	90	100			
3F12chim	EDLAVYYC [QQYYSYPRT]	FGGGTKLEIKR	(SEQ ID NO:27)		
	* *	* *			
3F12.v14	EDFATYYC [QQYYSYPRT]	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:108)		
		* * *			
hum kI	EDFATYYC [QQYNLSPWT]	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:40)		

FIG. 26A

Heavy Chain Variable

	10	20	30	40	
3F12chim	QGQLQOQSGAELMKPGASVKISCKAT	[GYTFSSYWIE]	WVKQR		
	** ** *	* ** *			* *
3F12.v14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFSSYWIE]	WVRQA		
		*	***		
humhviii	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA		
	50	a	60	70	80
3F12chim	PGHGLEWIG [EISPGSGSTNYNEEFKG]	KATFTADKSSNTAYI			
	* *	* *	* * *		*
3F12.v14	PGKGLEWVG [EINPGSGSTIYNEKFKG]	RATFSADNSKNTAYL			
	* * ****	* ****	* * *		*
humhviii	PGKGLEWVS [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL			
	abc	90	100ab	110	
3F12chim	QLSSLSTEDSAVYYCAD	[GYH-----GY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:29)					
	** ** *		**		
3F12.v14	QMNSLRAEDTAVYYCAD	[GYH-----GY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:109)					
		*	*****		
humhviii	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS		
(SEQ ID NO:41)					

FIG. 26B

32 / 32

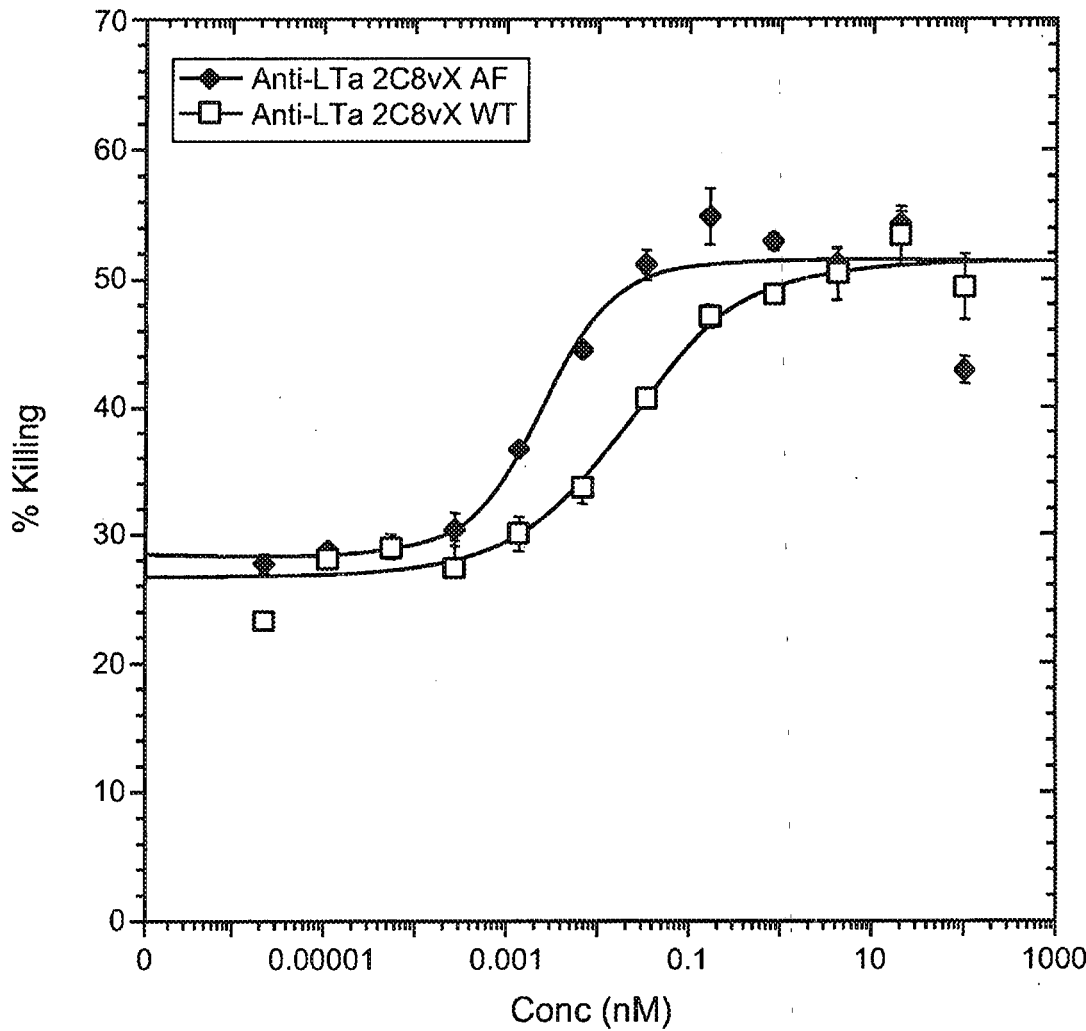


FIG. 27

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional(43) Fecha de Publicación Internacional
29 de mayo de 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/063776 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 16/24 (2006.01) **A61P 37/06** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **C07K 14/525** (2006.01)

(74) Agente: HASAK, Janet E.; Genentech, Inc., MS 49, 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(21) No. Solicitud Internacional:

PCT/US2007/081154

(22) Fecha de Presentación Internacional:

11 de octubre de 2007 (11.10.2007)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

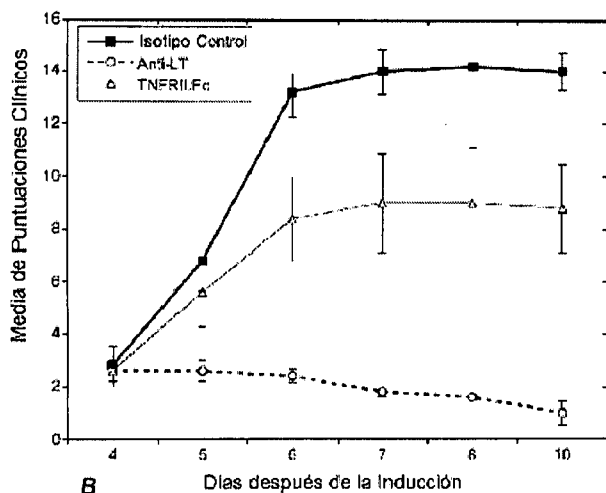
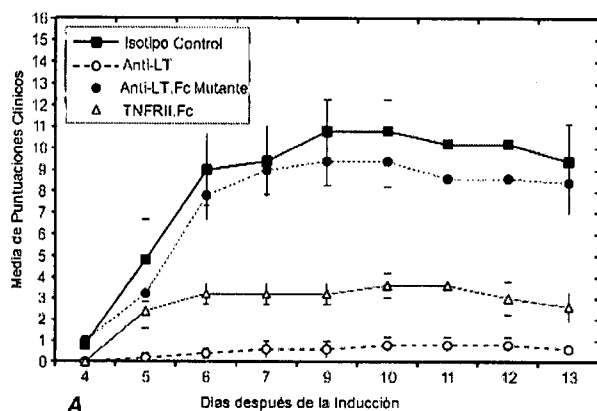
60/829,257 12 de octubre de 2006 (12.10.2006) EU
60/938,999 18 de mayo de 2007 (18.05.2007) EU**Solicitante** (para todos los países destinatarios con excepción de EU): **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) Inventores, e

(75) **Inventores/Solicitantes** (para US únicamente):
ADAMS, Camellia W. [EU/EU]; 116C Flynn Avenue, Mountain View, CA 94043 (EU). **GROGAN, Jane L.** [EU/EU]; 335 Hugo Street, San Francisco, CA 94122 (EU). **GURNEY, Austin L.** [EU/EU]; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (EU). **MCCUTCHEON, Krista** [EU/EU]; 1512 Carol Avenue, Burlingame, CA 94010 (EU).(81) **Países designados** (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) **Países designados** (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Publicado:**

- sin el informe internacional de búsqueda y para ser nuevamente publicado al recibir dicho reporte.
- con el listado de secuencias como parte de la descripción publicada separada en forma electrónica y disponible bajo requerimiento de la Oficina Internacional.

(54) Título: ANTICUERPOS PARA LINFOTOXINA-ALFA

(57) **Extracto:** La invención proporciona varios anticuerpos que se unen a linfotóxina- α , métodos para hacer tales anticuerpos, composiciones y artículos que incorporan dichos anticuerpos, y sus usos en el tratamiento de, por ejemplo, un trastorno autoinmune. Los anticuerpos incluyen anticuerpos murinos, quiméricos, y humanizados.

21/3

48130/09

1

ANTICUERPOS PARA LINFOTOXINA-ALFA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud no provisional reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud
5 Provisional de los Estados Unidos Ser. No. 60/829,257 presentada el 12 de
Octubre de 2006, y de la solicitud provisional de los Estados Unidos Ser. No.
60/938,999 presentada el 18 de Mayo de 2007, las cuales se incorporan mediante
referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a anticuerpos y sus usos para el tratamiento de
trastornos autoinmunes. Más particularmente, la presente invención se refiere a
anticuerpos que se unen a linfotoxina- α y pueden también bloquear la unión del
ligando linfotoxina- α a uno o más receptores.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

TNF y LT

Las enfermedades autoinmunes siguen siendo enfermedades clínicamente
importantes en los seres humanos. Como el nombre implica, las enfermedades
autoinmunes provocan sus estragos a través del propio sistema inmune del
cuerpo. Si bien los mecanismos patológicos difieren entre los tipos individuales de
20 enfermedades autoinmunes, un mecanismo general involucra la unión de ciertos
anticuerpos (en lo sucesivo, referidos en esta especificación como anticuerpos
auto-reactivos o autoanticuerpos) presentes. Los médicos y científicos han
identificado más de 70 enfermedades autoinmunes clínicamente diferentes,
incluyendo la artritis reumatoide (RA, siglas en inglés), esclerosis múltiple (ME,
25 siglas en inglés), vasculitis, diabetes mediada por el sistema inmune, y lupus tal
como el lupus eritematoso sistémico (SLE, siglas en inglés). Si bien muchas
enfermedades autoinmunes son raras - afectan a menos de 200,000 personas- en
conjunto, estas enfermedades afectan a millones de estadounidenses, se calcula
que el cinco por ciento de la población, con las mujeres afectadas de manera

desproporcionada por la mayoría de las enfermedades. La naturaleza crónica de estas enfermedades conduce a una enorme carga social y financiera.

Las proteínas relacionadas con el Factor de Necrosis Tumoral (TNF, siglas en inglés) son reconocidas en el arte como una gran familia de proteínas con una
5 variedad de actividades que van desde la defensa del hospedero hasta la regulación inmune de la apoptosis. El TNF se identificó por primera vez como un factor derivado del suero que era citotóxico para varias líneas celulares transformadas *in vitro* y causó la necrosis de ciertos tumores *in vivo*. Un factor similar en la superfamilia fue identificado y referido como linfotoxina ("LT"). Debido
10 a las similitudes observadas entre el TNF y la LT, en los inicios de los 1980, se propuso que el TNF y LT se referirían como TNF- α y TNF- β , respectivamente. La literatura científica, por tanto hace referencia a ambas nomenclaturas. Tal como se utilizan en la presente solicitud, el término "TNF" se refiere a TNF- α . Más tarde, la investigación reveló dos formas de linfotoxina, referidas como LT α y LT β . US
15 2005-0129614 describe otro miembro polipeptídico de la superfamilia de ligandos TNF la sobre la base de las similitudes estructurales y biológicas, designado como TL-5. Los miembros de la familia de proteínas TNF existen en formas unidas a la membrana que actúan a nivel local a través de contacto célula-célula, o como proteínas secretadas. Una familia de receptores relacionados con el TNF
20 reacciona con estas proteínas y desencadena una variedad de vías de señalización incluyendo apoptosis o muerte celular, proliferación celular, diferenciación de tejidos, y respuestas proinflamatorias. El TNF- α por sí mismo ha estado involucrado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, bacterianas y parasitarias, neoplasias, y/o enfermedades
25 neurodegenerativas y es una diana útil para la terapia biológica específica en enfermedades tales como la RA y la enfermedad de Crohn.

La clonación de las proteínas TNF y LT α y caracterización posterior de sus respectivas actividades biológicas, divulgan que las proteínas se diferencian en muchos aspectos (Aggarwal y otros, *Cytokines y Lipocortins in Inflammation y*
30 *Differentiation*, Wiley-Liss, Inc. 1990, pg. 375-384). Por ejemplo, la LT α es una proteína soluble secretada, de aproximadamente 20 kDa (25 kDa si es N- y O-glicosilada). El TNF, en cambio, no tiene sitio para la glicosilación y es sintetizado

con un dominio de transmembrana aparente que resulta en la proteína original transcrita que está asociada a la célula. La proteólisis de la proteína TNF asociada a la célula resulta en la liberación de la forma soluble de la proteína con un peso molecular de aproximadamente 19 kDa. El TNF es producido principalmente por macrófagos activados, mientras que la LT es producida por linfocitos activados (Wong y otros, *Tumor Necrosis Factors: The Molecules and their Emerging Role in Medicine*, Beutler, B., ed., Raven Press (1991), pg. 473-484). Las secuencias que codifican para el TNF y la LT α también difieren. El TNF y la LT α comparten sólo aproximadamente el 32% de identidad de secuencia de aminoácidos. En cuanto a las diferentes actividades biológicas del TNF y la LT α , el TNF incrementa la producción de interleucina-1 ("IL-1") por las células endoteliales, mientras que la LT α tiene poco efecto sobre esto. Además, el TNF induce la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos a partir de los macrófagos, mientras que la LT α no tiene ningún efecto sobre esto. Estas y otras actividades biológicas son abordadas en Aggarwal, *Tumor Necrosis Factors: Structure, Function y Mechanism of Action*, Aggarwal y Viced, eds. (1992), pg. 61-78.

El TNF y la LT α se describen con más detalle en la revisión de artículos por Spriggs, "Tumor Necrosis Factor: Basic Principles y Preclinical Studies", *Biologic Therapy of Cancer*, DeVita y otros, eds., J.B. Lippincott Company (1991) Ch. 16, pg. 354-377; Ruddle, *Current Opinion in Immunology*, 4:327-332 (1992); Wong y otros, "Tumor Necrosis Factor", *Human Monocytes*, Academic Press (1989), pg. 195-215; y Paul y otros, *Ann. Rev. Immunol*, 6:407- 438 (1988).

En las células no tumorales, el TNF y las citocinas relacionados con el TNF son activas en una variedad de respuestas inmunes. Ambos ligandos, TNF y LT α , se unen a y activan los receptores del TNF (p55 ó p60 y p75 ó P80; en lo sucesivo denominados "TNF-R").

Los complejos LT de la superficie celular se han caracterizado en células de hibridoma de células T CD4+ (11-23.D7), que expresan altos niveles de LT (Browning y otros, *J. Immunol.*, 147: 1230-1237 (1991); Androlewicz y otros, *J. Biol. Chem.*, 267: 2542-2547 (1992)). La expresión y función biológica de los LT β -R, subunidades de LT, y complejos LT de superficie se examinan en Ware y otros,

"The ligands and receptors of the linfoxin system", en *Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol*, Springer-Verlag, pg. 175-218 (1995).

- La expresión de LT α es inducida y la LT α es secretada principalmente por los linfocitos T y B activados y las células asesinas naturales (NK, siglas en inglés).
- 5 Entre las subclases de células T auxiliaadoras, la LT α parece ser producida por las células Th1 pero no Th2. La LT α también ha sido detectada en los melanocitos. La LT β (también denominada p33) ha sido identificada en la superficie de los linfocitos T, líneas de células T, líneas de las células B y células asesinas activadas por linfoquinas (LAK, siglas en inglés). Los estudios han demostrado
- 10 que LT β no es funcional en ausencia de LT α
- La LT α existe, ya sea como un homotrímero (LT α 3) o un heterotrímero con LT β . Estos heterotrímeros contienen ya bien dos subunidades de LT α y una subunidad de LT β (LT α 2 β 1), o una subunidad de LT α y dos de LT β (LT α 1 β 2).
- Los únicos receptores de superficie celular para el homotrímero de LT α son dos
- 15 receptores del TNF, p55 y p75. Sin embargo, el heterotrímero LT α β , LT α 1 β 2, no se une a los receptores del TNF y en su lugar se une a un miembro de la superfamilia de los receptores del TNF, el receptor de la linfoxina β (en lo sucesivo, LT β -R). La forma heterotrimérica LT α 2 β 1 probablemente se una a los receptores del TNF.
- 20 El LT β -R tiene un papel bien descrito, tanto en el desarrollo del sistema inmunológico como en el mantenimiento funcional de un número de células en el sistema inmunológico, incluyendo las células dendríticas foliculares y una serie de tipos de células estromales (Matsumoto y otros, *Immunol. Rev.* 156: 137 (1997)). Ligandos conocidos para LT β -R incluyen no solamente LT α 1 β 2, sino también un
- 25 segundo ligando llamado LIGHT (Mauri y otros, *Immunity* 8:21 (1998)). La activación de LT β -R ha mostrado que induce la muerte apoptótica de ciertas líneas celulares de cáncer *in vivo* (US 6,312,691). Anticuerpos humanizados para LT β -R y métodos de uso de los mismos se proporcionan en US 2004-0058394, de los cuales se plantea que son útiles para tratar o reducir el avance, la gravedad, o
- 30 los efectos de las neoplasias en los seres humanos. Además, EP 1585547 (WO 2004/058183) (Lepage y Gill) divulga las terapias de combinación que incluyen una composición que activa señalización de LT β -R en combinación con otro u o

más de otros agentes quimioterapéuticos, así como métodos terapéuticos y métodos de cribado para la identificación de los agentes que en combinación con un agente agonista de $LT\beta$ -R tienen un efecto aditivo sobre la inhibición tumoral.

La LT es importante para la linfomeogénesis, según se evidencia a partir de ratones noqueados. Ver Futterer y otros *Immunity*, 9 (1): 59-70 (1998), quienes muestran que los ratones deficientes en $LT\beta$ -R carecían de los ganglios linfáticos y de las placas de Peyer y también mostraban afectada la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Rennert y otros, *Immunity*, 9 (1): 71-9 (1998) reportaron que un anticuerpo monoclonal agonista contra $LT\beta$ -R restauró la capacidad de generar los ganglios linfáticos en ratones noqueados para $LT\alpha$. Véase también Wu y otros, *J. Immunology*, 166 (3): 1684-9 (2001) y Endres y otros., *J. Exp. Med.*, 189 (1): 159-68 (1999); Dohi y otros., *J. Immunology*, 167 (5): 2781-90 (2001); y Matsumoto y otros., *J. Immunology*, 163 (3): 1584-91(1999). Korner y otros. *Eur. J. Immun.*, 27 (10): 2600-9 (1997) reportaron que los ratones que carecen tanto de TNF como de LT mostraron maduración de las células B retardada y deficiencias de inmunoglobulina en el suero, mientras que los ratones que carecen de TNF solamente no mostraron tales deficiencias.

Además, la LT es importante para la inflamación. La $LT\alpha$ es sobreexpresada en el páncreas de PIR. Ratones transgénicos para $LT\alpha$, los cuales han mostrado inflamación, incrementaron la expresión de quimiocinas, y una estructura tipo linfoide, y en los cuales la sobreexpresión de $LT\beta$ solamente no ha demostrado la existencia de inflamación adicional. Además, los ratones deficientes en $LT\alpha$ exhibieron una producción afectada de TNF- α , y que la arquitectura esplénica defectuosa y la función se restauran cuando estos ratones son cruzados con transgénicos para el TNF (Kollias, *J. Exp. Med.*, 188:745 (1998); Chaplin, *Ann Rev Imm.* 17:399 (1999)), y que los niveles de TNF disminuidos se restauran después del reto con patógenos (Eugster, *Eur. J. Immun.* 31: 1935 (2001)).

Cuando el TNF- α o la $LT\alpha3$ interactúan con los receptores del TNF, TNFRI y/o TNFRII, los resultados son respuestas proinflamatorias y/o apoptosis. Cuando $LT\alpha1\beta2$ interactúa con el receptor $LT\beta$ -R, el resultado es linfomeogénesis e inducción de moléculas de adhesión y quimiocinas. Las enfermedades autoinmunes están asociadas con linfomeogénesis y las respuestas inflamatorias,

- y existe una expresión incrementada de LT en pacientes con enfermedad autoinmune, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), y RA (Weyand y otros, *Curr. Opin. Rheumatol*, 15: 259-266 (2003); Selmaj y otros, *J. Clin. Invest.*, 87: 949-954 (1991); Matusevicius y otros, *J. Neuroimm.*, 66: 115-123 (1996); Powell y otros, *International Immunology*, 2 (6): 539-44 (1990); Zipp y otros, *Annals of Neurology*, 38/5: 723-730 (1995); Voskuhl y otros, *Autoimmunity* 15 (2): 137-43 (1993); Selmaj y otros, *J. Immunology*, 147: 1522-29 (1991); Agyekum y otros, *Journal Pathology*, 199 (1): 115-21 (2003); y Takekuma y otros, *J. Immunol*, 167: 1072 (2001)).
- 10 En cuanto a la MS específicamente, la LT α en el suero se correlaciona con lesiones/carga de enfermedad en la MS (Kraus y otros, *Acta Neurologica Scandinavica*, 105 (4): 300-8 (2002)). La LT α está involucrada en la desmielinización, pero no en la remielinización un modelo *in vivo* de cuprizona, mientras que el TNF- α es necesario para ambos procesos (Plant y otros, *Glia* 49: 1-14 (2005)).
- 15 Específicamente en cuanto a la RA, los niveles de LT α 3 y TNF- α humanos en los pacientes con RA son más elevados que en los donantes normales (Stepien, *Eur Cytokine Net* 9: 145 (1998)). Las funciones de LT α en la RA incluyen: La LT α en el suero está presente en algunos pacientes con RA, la proteína LT α incrementada está presente en el sinovio, la vía de LT está asociada con la linfomogénesis ectópica en el sinovio, y hay una expresión incrementada de LT β -R en sinoviocitos similares a fibroblastos en los pacientes con RA. Además, un caso reporte divulga que la neutralización de LT α 3 es beneficioso para un paciente de RA resistente a infliximab (Buch y otros, *Ann. Rheum. Dis.*, 63: 1344-46 (2004)). Además, Han y otros, *Arthrit. Rheumat*, 52: 3202-3209 (2005) describen que el bloqueo de la vía de LT exacerba la artritis autoinmune mediante la mejora de la respuesta Th1.
- 20 La eficacia preclínica para la prevención y el tratamiento con LT β R-Ig en la artritis inducida por colágeno (CIA) se muestra en Fava y otros, *J. Immunology*, 171 (1): 115-26 (2003). Además, los ratones deficientes en LT α son resistentes a la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (Suen y otros, *J. Exp. Med*, 186: 1233-40 (1997); Sean Riminton y otros, *J. Exp. Med*, 187 (9): 1517-28 (1998)). Allí
- 30

también se publica la eficacia de LT β R-Ig en EAE (Gommerman y otros, *J. Clin. Invest.*, 112 (5): 755-67 (2003)). Además, el LT β R-Ig perturba la linfogénesis en ratones. Mackay y otros, *Europ. J. Immunol.* 27 (8): 2033-42 (1997)). Adicionalmente, la administración de LT β R-Ig disminuye diabetes mellitus (IDDM) dependiente de insulina en ratones obesos no diabéticos (Wu y otros, *J. Exp. Med.*, 193 (1 1): 1327-32 (2001)). La función de la LT en la linfogénesis en primates no humanos ha sido investigada por Gommerman y otros, *J. Clin. Invest.* 110 (9): 1359-69 (2002) usando LT β R-Ig. Por otra parte, los ratones deficientes en LT α son menos susceptibles a *M. bovis* BCG que los ratones deficientes en TNF- α . Eugster y otros, *Europ. J. Immunol.*, 31: 1935 (2001). La LT también se ha utilizado para tratar el cáncer. Véase US 5,747,023.

Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que exhiben especificidad de unión para un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son glicoproteínas heterotetraméricas normalmente de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está relacionada con una cadena pesada por un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera y pesada también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número constante de dominios. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo, el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Residuos de aminoácidos particulares se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y son los responsables para la especificidad de unión de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye

- uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Esta se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones de los marcos (FRs). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas, cada uno de los cuales comprende cuatro FRs, adoptan en su mayor parte la configuración de una hoja β , conectados mediante tres CDRs, los cuales forman lazos de conexión y, en algunos casos forman parte de la estructura de hoja β . Los CDRs en cada cadena se mantienen unidos en estrecha proximidad por las FRs y, con los CDRs provenientes de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).
- 15 Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas pueden ser asignados a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas son llamadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. De las clases de inmunoglobulinas humanas, solamente la IgG1, IgG2, IgG3, e IgM humanas se conoce que activan el complemento, y las
- 20 IgG1 e IgG3 humanas median la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) más eficientemente que IgG2 e IgG4.

- Dos principales enfoques han sido utilizados para desarrollar compuestos terapéuticos que inhiban el TNF- α . El primero, ejemplificado por el infliximab, un anticuerpo monoclonal quimérico para TNF- α , también conocido como
- 30 Remicade®, es neutralizar la acción del TNF- α por medio de un anticuerpo monoclonal específico de alta afinidad y potencia para evitar la unión del TNF- α a sus receptores. El segundo, ejemplificado por etanercept, también conocido como

ENBREL®, es inhibir el TNF- α usando una molécula basada en un receptor del TNF que funciona como un "señuelo" para reducir la unión del TNF- α a sus receptores naturales. Aunque ambos tipos de moléculas pueden impedir la unión del TNF α a sus receptores, los receptores basados en inhibidores, tales como el
5 etanercept, también evitarán la unión del receptor a LT α .

En la literatura de patentes, los anticuerpos para caquectina (TNF), divulgados por EP 212489, son reportados como útiles en inmunoensayos diagnósticos y en terapia de choque en las infecciones bacterianas. EP 218868 divulga anticuerpos monoclonales para TNF humano y sus usos. EP 288088 divulga anticuerpos anti-
10 TNF, y su utilidad en inmunoensayos diagnósticos de patologías, en particular de la patología de Kawasaki y la infección bacteriana. Anticuerpos anti-TNF también se describen, por ejemplo, en EP 1585477 (Giles-Komar y otros); US 2006-0147452, US 2006-0222646, y US 2006-0121037. Un método de tratar la RA utilizando una construcción de un polipéptido de anticuerpo de dominio simple que
15 antagoniza con la unión del TNF α humano a un receptor, se describe en US 2005-0271663. Los métodos de tratamiento de la RA utilizando proteínas de fusión anti-receptor de TNF, se describen en US 2005-0260201. Los métodos para tratar una enfermedad mediada por el TNF, incluyendo la RA, la enfermedad de Crohn, aguda y crónica y enfermedades asociadas con el trasplante, utilizando una
20 composición que comprende metotrexato y un anticuerpo anti-TNF, se describen en EP 1593393. Anticuerpos que se unen a TNF-R incluyen aquellos descritos en US 7,057,022. Nuevas proteínas con, actividad antagonista del TNF-alfa se describen en US 7,056,695. US 2006-0147448 divulga el tratamiento de trastornos renales inmunológicos mediante inhibidores de la vía de la LT.

25 La LT β y los complejos LT β /LT α y LT β -R y los anticuerpos para los mismos, así como los agentes bloqueadores de LT β son descritos por ejemplo, en WO 1992/00329; WO 1994/13808; US 5,661,004; US 5,795,964; EP 0954333, US 5,670,149; US 5,925,351; US 2005-0037003; US 6,403,087; US 6,669,941; US 6,312,691; US 7,001,598; US 7,030,080; US 2006-0222644, y US 2005-0163747.
30 La solicitud US 2006-0134102 divulga LT β -R en combinación con agentes quimioterapéuticos. Los anticuerpos para el LT β -R se describen en US 2005-0281811. Véase también WO 2006/114284 en relación con el uso de anticuerpos

para LT β -R a fin de prevenir y/o tratar la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad. Anticuerpos humanizados específicos para LT β -R, solos o en combinación con agentes quimioterapéutico(s) en métodos terapéuticos son divulgados en el EP 1539793. La LT α y anticuerpos para la misma se describen, por ejemplo, en US 4,959,457, US 5,824,509, US 4,920,196 y US 5,683,688; US 2005-0266004 (WO 2005/067477) y US 5,188,969 (EP 347728 B1). Véase también US 2002-0039580; WO 2004/039329; y US 2002-0197254 en relación con la tecnología de LT β -R o LT β . Anticuerpos multivalentes (que unen a la superfamilia de receptores del TNF) se describen, por ejemplo, en US 2002-0004587 y US 2006-0025576.

Existe una necesidad continua en el arte de producir anticuerpos, en particular, anticuerpos terapéuticos que tengan función mejorada, tales como los anticuerpos contra la LT α o fragmentos de los mismos que bloqueen la LT α , ya que la LT α tiene más interacciones con los diversos receptores que el TNF- α o la LT β solamente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se basa en parte en la identificación de una variedad de antagonistas de la vía biológica de la LT, la cual es un proceso biológico/celular que se presenta como una importante diana terapéutica. La invención proporciona composiciones y métodos basados en la interferencia con la activación de LT α , incluyendo pero no limitado a la interferencia de la unión de LT α a los diversos receptores.

En consecuencia, la invención es según se reivindica. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α) aislado que comprende al menos una secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada a partir del grupo que consiste de:

- (a) una secuencia CDR-L1 que comprende los aminoácidos A1-A11, donde A1-A11 es KASQAVSSAVA (ID SEC NO: 1) o RASQAVSSAVA (ID SEC NO: 2), o comprende los aminoácidos A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYSTNQKNFLA (ID SEC NO: 3) o KSSQSLLYSANQKNFLA (ID SEC NO: 4) o KSSQSLLYSTNQKNALA (ID SEC NO: 6), donde N es

cualquier aminoácido (quimérico 2C8 o humanizado 2C8.v2/2C8.vX o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5/humanizado 3F12.v14, o 3F12 clon 14 ó 17, respectivamente);

- 5 (b) una secuencia CDR-L2 que comprende los aminoácidos B1-B7, donde B1-B7 es SASHRYT (ID SEC NO: 7) o WASTRDS (ID SEC NO: 8) (quimérico 2C8/humanizado 2C8.v2/humanizado 2C8.vX o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5/humanizado 3F12.v14, respectivamente);
- 10 (c) una secuencia CDR-L3 que comprende los aminoácidos C1-C9, donde C1-C9 es QQHYSTPWT (ID SEC NO: 9) o QENYSTPWT (ID SEC NO: 11) o QQYYSYPRT (ID SEC NO: 13) o QQYASYPRT (ID SEC NO: 14) o QQYYAYPRT (ID SEC NO: 15), donde N es cualquier aminoácido (quimérico 2C8/humanizado 2C8.v2 o 2C8 clon G7 o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5/o humanizado 3F12.v14 clon 3F12 20 o 3F12 clon 21, respectivamente);
- 15 (d) una secuencia CDR-H1 que comprende los aminoácidos D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYVIH (ID SEC NO: 16) o GYTFSSYWIE (ID SEC NO: 17) (quimérico 2C8/humanizado 2C8.v2/humanizado 2C8.vX o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5/humanizado 3F12.v14, respectivamente);
- 20 (e) una secuencia CDR-H2 que comprende los aminoácidos E1-E17, donde E1-E17 es YNNPYNDGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 18) o EISPGSGSTNYNEEFKG (ID SEC NO: 19) o YNNPYNAGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 101) o EINPGSGSTIYNEKFKG (ID SEC NO: 110), donde N es cualquier aminoácido (quimérico 2C8/humanizado 2C8.v2 o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5, o humanizado 2C8.vX, o humanizado 3F12.v14, respectivamente), y
- 25 (f) una secuencia CDR-H3 que comprende los aminoácidos F1-F9, donde F1-F9 es PTMLPWFAY (ID SEC NO: 20), o comprende los aminoácidos F1-F5, donde F1-F5 es GYHGY (ID SEC NO: 21) o GYHGA (ID SEC NO: 22) (quimérico 2C8/humanizado 2C8.v2/humanizado 2C8.vX o quimérico 3F12/humanizado 3F12.v5/humanizado 3F12.v14 o 3F12 clon 12, respectivamente).
- 30

Preferiblemente, la ID SEC NO: 3 es KSSQSLLYSTAQKNFLA (ID SEC NO: 5) (3F12 clon 15). En otro aspecto preferido, la ID SEC NO: 11 es QESYSTPWT (ID SEC NO: 10) (2C8 clon A8/humanizado 2C8.vX) o QEVYSTPWT (ID SEC NO: 12) (2C8 clon H6).

- 5 En una realización preferida adicional, la secuencia CDR-L1 es la ID SEC NO: 2 ó 3 ó 4 ó 6.

En otro aspecto preferido, el anticuerpo comprende o bien (i) la totalidad de las secuencias de aminoácidos de CDR-L1 a CDR-L3 de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 y 9, o de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 u 8 y 11, o de las ID SEC NOS: 3, 8, y 13, o de
10 las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 13, o de las ID SEC NOS: 3, 8, y 14 ó 15, o de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 14 ó 15, o (ii) todas las secuencia de aminoácidos de CDR-H1 a CDR-H3 de las ID SEC NOS: 16, 18 y 20, o la totalidad de las ID SEC NOS: 16, 101, y 20, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 19, y 21 ó 22, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 110, y 21.

- 15 En un aspecto aún más preferido, el anticuerpo comprende o bien la totalidad de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 y 9, o la totalidad de las ID SEC NOS: 16, 18 y 20, o la totalidad de las ID SEC NOS: 16, 101, y 20. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende o bien la totalidad de las ID SEC NOS: 3, 8, y 13, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 19, y 21 ó 22. En una realización alternativa, el
20 anticuerpo comprende o bien la totalidad de las ID SEC NOS: 4, 8, y 14, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 110, y 21. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende (i) la totalidad de las secuencias de aminoácidos de CDR-L1 a CDR-L3 de las ID SEC NOS: 1 ó 2, 7 y 9, o de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 u 8 y 11, o de las ID SEC NOS: 3, 8, y 13, o de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 13, o de las ID
25 SEC NOS: 3, 8, y 14 ó 15, o de ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 14 ó 15, y (ii) la totalidad de las secuencias de aminoácidos de CDR-H1 a CDR-H3 de las ID SEC NOS: 16, 18 y 20, o las ID SEC NOS: 16, 101, y 20, o de las ID SEC NOS: 17, 19, y 21 ó 22, o de las ID SEC NOS: 17, 110, y 21.

Además, los anticuerpos de la presente especificación son preferiblemente
30 quiméricos o humanizados, más preferiblemente humanizados. Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias de las regiones que no son CDR (por ejemplo, las regiones del marco) consenso

humanas y/o humanas apropiadas en sus dominios variables de las cadenas ligera y/o pesada, siempre y cuando el anticuerpo exhiba las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). Preferiblemente, al menos una porción de tal secuencia de la región del marco del anticuerpo humanizado es una secuencia del marco consenso humana.

En algunas realizaciones, una o más modificaciones adicionales están presentes en las secuencias de las regiones que no son CDR (por ejemplo, las regiones del marco) consenso humanas y/o humanas. En una realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo para la invención comprende, al menos, una porción de (preferiblemente todas) una secuencia de la región del marco consenso humana, la cual en una realización es la secuencia de la región del marco consenso del subgrupo III. En una realización, un anticuerpo para la invención comprende una variante de la secuencia de la región del marco consenso del subgrupo III modificada en al menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una realización, una variante de la secuencia de la región del marco consenso del subgrupo III puede comprender una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, y/o 78. En una realización, dicha sustitución es R71A, N73T, y/o N78A, en cualquier combinación de las mismas, preferiblemente las tres. En otra realización, estos anticuerpos comprenden o comprenden además al menos una porción de (preferiblemente la totalidad) de una secuencia de la región del marco consenso de la cadena ligera κ humana. En una realización preferida, un anticuerpo para la invención comprende, al menos, una porción de (preferiblemente la totalidad) una secuencia consenso de la región del marco del subgrupo I κ humana.

La posición del aminoácido/delineación del límite de un CDR de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las distintas definiciones conocidas en el arte (como se describe a continuación). Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden ser vistas como posiciones hipervariables híbridas pues estas posiciones pueden considerarse dentro de un CDR en virtud de una serie de criterios, mientras que se pueden considerar fuera de un CDR bajo un conjunto de criterios diferentes. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en CDRs extendidos (como se define posteriormente). La invención

proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94, y 102 en un dominio variable de la cadena pesada. En una realización, estas

5 posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 56, y 97 en un dominio variable de la cadena ligera. En una realización, un anticuerpo para la invención comprende una variante de la secuencia de la región del marco consenso de subgrupo humano, modificada en una o más posiciones hipervariables híbridas.

- 10 En otro aspecto preferido, el anticuerpo se une a LT α 3 y bloquea la interacción de LT α 3 con el receptor del factor de necrosis tumoral-1 (TNFRI) y el receptor del factor de necrosis tumoral-2 (TNFRII). Preferiblemente, éste se une también a uno o más complejos de LT $\alpha\beta$ y especialmente sobre la superficie celular. Preferiblemente, éste también bloquea la función de uno o más complejos de
- 15 LT $\alpha\beta$. Además, éste preferiblemente disminuye los niveles de citocinas inflamatorias asociadas a la artritis reumatoide en un ensayo de artritis *in vitro*, tal como un ensayo de artritis inducida por colágeno *in vitro* o un ensayo de artritis inducida por anticuerpos *in vitro*.

En algunos aspectos, el anticuerpo tal como el S5H3 murino, no bloquea la

20 interacción de LT $\alpha\beta$ con LT β -R. En otros aspectos, el anticuerpo no bloquea la interacción de LT $\alpha\beta$ con LT β -R. Preferiblemente, el anticuerpo modula las células que expresan LT $\alpha\beta$. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-LT α neutraliza sustancialmente al menos una actividad de al menos una proteína LT α . Preferiblemente, el anticuerpo para la presente especificación tiene como objetivo

25 cualquier célula que exprese LT α , y más preferiblemente depleta las células que secretan o son positivas para LT α .

El anticuerpo preferido se une a LT α con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-12} M (niveles picomolares) y, más preferiblemente de al menos aproximadamente 10^{-13} M. También preferido es un anticuerpo IgG, y más

30 preferiblemente la IgG humana. La IgG humana abarca cualquiera de los isotipos de IgG humana de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgG murina abarca los isotipos IgG1, 2a, 2b, y 3. Más preferiblemente, la IgG murina es la IgG2a y la IgG

humana es la IgG1. En otras realizaciones preferidas de la IgG humana, las secuencias de VH y VL proporcionadas están unidas a la región constante de la IgG1.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LT α con un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 23 ó 24, un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 25 ó 26, o que tiene los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada que comprenden ambas ID SEC NOS: 23 y 25, o que comprende ambas ID SEC NOS: 24 y 26.

En aún una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-LT α que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 27 ó 28, un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 29 ó 30 ó 31, o que tiene los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada que comprenden ambas ID SEC NOS: 27 y 29, o que comprenden ambas ID SEC NOS: 27 y 30, o que comprenden ambas ID SEC NOS: 27 y 31, o que comprenden ambas ID SEC NOS: 28 y 30, o que comprenden ambas ID SEC NOS: 28 y 31.

En aún un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-LT α que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 102, un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 103, o que tiene los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada que comprenden ambas ID SEC NOS: 102 y 103.

En aún un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-LT α que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 108, un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 109, o que tiene los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada que comprenden ambas ID SEC NOS: 108 y 109.

En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo tiene una región Fc. En un aspecto, tal región Fc es una región Fc del tipo salvaje (o de secuencia nativa). En otra realización, el anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos en su región Fc que resulta en que el polipéptido exhiba al menos

una de las siguientes propiedades: unión a FcγR incrementada, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) incrementada, CDC disminuida, ADCC incrementada y función CDC, ADCC incrementada pero
 5 función CDC disminuida, unión a FcRn incrementada, y vida media en suero incrementada, en comparación con un anticuerpo que tiene la secuencia de la región Fc nativa. Más preferiblemente, el anticuerpo además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en su región Fc, que resultan en que éste tenga la función ADCC incrementada en comparación con el mismo anticuerpo
 10 que tiene la secuencia de la región Fc nativa.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo tiene sustituciones de aminoácidos en su región Fc, en una cualquiera o cualquier combinación de las posiciones que son 268D, o 298A, o 326D, o 333A, o 334A, o 298A junto con 333A, o 298A junto con 334A, o 239D junto con 332E, o 239D junto con 298A y
 15 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332A, 239D o junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 330L y 332E y 272Y y 254T y 256E, o 250Q junto con 428L, o 265 A, o 297A, donde la sustitución 265A es en ausencia de 297A y la
 20 sustitución 297A es en ausencia de 265 A. En una realización particular, la región Fc tiene desde una a tres de tales sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y 334, y más preferiblemente la combinación de 298A, 333A y 334A. La letra después del número en cada una de estas designaciones representa el aminoácido cambiado en esa posición.

25 Tales anticuerpos anti-LTα efectúan diversos grados de perturbación de la vía de señalización de LTα/LTβ. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LTα (preferiblemente humanizado) donde la afinidad monovalente del anticuerpo para la LTα (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab para LTα humana) es aproximadamente la
 30 misma o mayor que la de un anticuerpo murino (por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo murino como un fragmento Fab para LTα humana) producido por una línea celular de hibridoma depositado bajo la American Type Culture Collection

Número de Acceso (ATCC) PTA-7538 (hibridoma murino Linfotóxina alfa2 beta1 s5H3.2.2). La afinidad monovalente es preferiblemente expresada en un valor de K_d y/o es medida mediante un biosensor óptico que utiliza la resonancia de plasmones de superficie (SPR) (Biacore®) o radioinmunoensayo.

- 5 Además, los anticuerpos de la presente especificación incluyen aquellos con cualquiera de las propiedades anteriores, que tienen fucosa reducida en relación con la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo producido en una célula de ovario de hámster chino de tipo salvaje de. Más preferidos son los anticuerpos que no tienen fucosa.
- 10 En otra realización, la invención proporciona una composición de anticuerpos que comprende los anticuerpos descritos en la presente especificación que tienen una región Fc, donde aproximadamente del 20-100% de los anticuerpos en la composición comprenden una estructura de carbohidrato de núcleo maduro en la región Fc que carece de una fucosa. Preferiblemente, tal composición comprende
- 15 anticuerpos que tienen una región Fc que ha sido alterada para cambiar una o más de las propiedades del anticuerpos tales como la ADCC, la CDC, o las propiedades farmacocinéticas en comparación con la secuencia de Fc de la IgG de tipo salvaje, mediante la sustitución de un aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste de A, D, E, L, Q, T, Y y en una cualquiera o cualquier
- 20 combinación de posiciones de la región Fc seleccionada del grupo consistente en: 238, 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414,
- 25 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438 y 439.

La composición de anticuerpos anteriormente descrita es Más preferiblemente una donde el anticuerpo comprende además una sustitución de Fc que es 268D o 326D o 333A junto con 334A, o 298A junto con 333A, o 298A junto con 334A, o 239D y junto con 332E, o 239D junto con 298A y 332E, o 239D junto con 268D y

- 30 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332A, o 239D o junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 332E , o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o 239D junto con 330L y 332E,

donde letra después del número en cada una de estas designaciones representa el aminoácido cambiado en esa posición.

La composición de anticuerpos anteriormente descrita es además, preferiblemente, una donde el anticuerpo se une a una FcγRIII. La composición es
5 una preferiblemente donde el anticuerpo tiene actividad ADCC en presencia de células efectoras humanas o tiene actividad ADCC incrementada en presencia de células efectoras humanas en comparación con el mismo anticuerpo si este comprendiera la Fc de la IgG1 de tipo salvaje humana. La composición también es una preferiblemente donde el anticuerpo se une a FcγRTII con mejor afinidad,
10 o media la ADCC de manera más eficiente, que una glicoproteína con una estructura de carbohidrato de núcleo maduro que incluye la fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína. Además, la composición es preferiblemente una donde el anticuerpo ha sido producido por una célula de ovario de hámster chino (CHO), preferiblemente una célula Lec13. La composición es también una
15 preferiblemente donde el anticuerpo se ha producido por una célula de mamífero carente de un gen de fucosiltransferasa, más preferiblemente del gen *FUT8*.

En una realización, la composición de anticuerpos anteriormente descrita es una donde el anticuerpo está libre de N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro. En una realización alternativa, la
20 composición es una donde el anticuerpo tiene N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

En otro aspecto, la composición anteriormente descrita es una donde el anticuerpo tiene uno o más residuos de galactosa unidos a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro. En una realización alternativa, la composición es
25 una donde el anticuerpo está libre de uno o más residuos de galactosa unidos a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

En otro aspecto, la composición anteriormente descrita es una donde el anticuerpo tiene uno o más residuos de ácido siálico unidos a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro. En una realización alternativa, la composición es
30 una donde el anticuerpo está libre de uno o más residuos de ácido siálico unidos a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

La composición anteriormente descrita, preferiblemente comprende al menos aproximadamente el 2% de los anticuerpos afucosilados, más preferiblemente al menos el 4% de los anticuerpos afucosilados, aún Más preferiblemente al menos el 10% de los anticuerpos afucosilados, aún Más preferiblemente al menos el 19% de los anticuerpos afucosilados, y lo Más preferiblemente es que comprende aproximadamente el 100% de los anticuerpos afucosilados.

También se incluye en la presente especificación es un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente cualquiera de los anticuerpos de la presente especificación.

- 10 Un agente terapéutico para usar en un sujeto hospedero, preferiblemente provoca una pequeña o ninguna respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado que provoca y/o se espera que provoque una respuesta humana de anticuerpos anti-ratón (HAMA) en un nivel sustancialmente reducido en
- 15 comparación con un anticuerpo murino en un sujeto hospedero. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado que provoca y/o se espera que provoque una respuesta humana de anticuerpos anti-ratón (HAMA) mínima o no provoque dicha respuesta. En un ejemplo, un anticuerpo para la invención provoca una respuesta de anticuerpos anti-ratón que está en el nivel
- 20 máximo aceptable clínicamente o por debajo del mismo.

Los anticuerpos de la invención se puede utilizar para modular uno o más aspectos de los efectos asociados a la $LT\alpha$, que incluyen pero no se limitan a la receptor activador de $LT\alpha$, la señalización molecular corriente abajo, la proliferación celular, la migración celular, la supervivencia celular, la morfogénesis

25 celular y la angiogénesis. Estos efectos pueden ser modulados por cualquier mecanismo biológicamente relevante, incluyendo la interrupción del ligando (por ejemplo, $LT\alpha$), y el bloqueo de la unión al receptor de la $LT\alpha 3$ o a uno o a ambos receptores heterodiméricos, así como la fosforilación del receptor, y/o la multimerización de los receptores.

- 30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la inhibición de la proliferación celular activada por $LT\alpha$, dicho método que comprende contactar una

célula o tejido con una cantidad efectiva de uno o más de los anticuerpos de la invención.

En una realización preferida, por ejemplo, la proliferación celular activada por LT α se debe a un trastorno autoinmune, más preferiblemente RA, esclerosis múltiple, 5 síndrome de Sjögren, lupus, miastenia gravis, o IBD, o cáncer, especialmente cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, un linfoma, o leucemia. En otra realización preferida, el método comprende además contactar la célula o tejido con un segundo medicamento, donde el primer medicamento es uno a más de los anticuerpos de la presente especificación. En una realización aún más 10 preferida, la célula o tejido es una célula o tejido de mamífero, más preferiblemente humanos, y aún Más preferiblemente el método es un método *in vivo*. En tal método preferido *in vivo*, preferiblemente, al sujeto que tiene la célula o el tejido, más preferiblemente un sujeto humano, se le administra la cantidad efectiva de los anticuerpos de la presente especificación, por ejemplo, mediante 15 administración subcutánea o intravenosa.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno autoinmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo para la invención. Preferiblemente, el trastorno autoinmune es seleccionado a partir del grupo que consiste de: artritis reumatoide 20 (RA), lupus, enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple (EM), psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis, tiroiditis de 25 Hashimoto, enfermedad de Graves, gastritis por *helicobacter pylori*, y hepatitis C crónica. Preferiblemente, el trastorno autoinmune es RA, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, lupus, miastenia gravis, o IBD, más preferiblemente el trastorno autoinmune es RA, IBD, lupus o esclerosis múltiple. Más preferiblemente, el lupus es lupus eritematoso sistémico o nefritis lúpica, y el BID 30 es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En un aspecto adicional, el anticuerpo se conjuga con otra molécula, tal como un agente

citotóxico.

En otro aspecto, el método es tal que el anticuerpo se administra por vía intravenosa. En una realización alternativa, el anticuerpo se administra por vía subcutánea.

- 5 En otra realización, el sujeto tiene RA y el anticuerpo induce una respuesta clínica importante en el sujeto. En otro aspecto, el sujeto tiene un nivel anormal de una o más citocinas reguladoras, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-factor reumatoide (RF), creatinina, nitrógeno ureico en sangre, anticuerpos anti-endoteliales, anticuerpos anti-neutrófilos citoplasmáticos (ANCA), células CD20
- 10 infiltrantes, anticuerpos anti-ADN de doble cadena (ADNdc), anticuerpos anti-Sm, anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares, anticuerpos anti-fosfolípidos, anticuerpos anti-ribosomales P, anticuerpos anti-Ro/SS-A, anticuerpos anti-Ro, anticuerpos anti-La, anticuerpos dirigidos contra los antígenos A o B asociados al síndrome de Sjögren (SS-A o SS-B), anticuerpos dirigidos contra la proteína B del
- 15 centrómero (CENP B) o la proteína C del centrómero (CENP C), autoanticuerpos para ICA69, anticuerpos anti-antígeno Smith (Sm), anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares, anticuerpos anti-ribosomales P, autoanticuerpos de tinción de la zona nuclear o perinuclear de los neutrófilos (pANCA), anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos que reaccionan de forma
- 20 cruzada con el gangliósido Gm1 o con el gangliósido GQ1b, anti-receptor de la acetilcolina (CAIS), anti-subtipo AchR, o anticuerpos anti-tirosina quinasa específica de músculo (MuSk), anticuerpos anti-células endoteliales del suero, IgG o anticuerpos anti-desmogleína (Dsg), anti-centrómero, anti-topoisomerasa-1 (Scl-70), anti-ARN polimerasa o anti-U3-ribonucleoproteína (U3-RNP),
- 25 anticuerpos anti-membrana basal glomerular (GBM), anticuerpos anti-mitocondriales (AMA) o anti-mitocondriales M2 anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anticuerpos anti-tiroglobina (TG) o anti-receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), anticuerpos anti-nucleico (AN), anti-actina (AA) o anti-antígeno del músculo liso (ASM), anticuerpos IgA anti-endomisial, IgA anti-
- 30 transglutaminasa tisular, IgA anti-gliadina o IgG anti-gliadina, anticuerpos anti-CYP21A2, anti-CYP11A1 o anti-CYP17, anticuerpos anti-ribonucleoproteína (RNP), o específicos para la miositis, anticuerpos anti-glicoproteína asociada a mielina (MAG), anticuerpos anti-virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpos anti-

gangliósido Gm1, anti-sulfato-3-glicuronil paraglobósido (SGPG), o anticuerpos IgM anti-glicoconjugado, anticuerpos IgM anti-gangliósido, anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anti-tiroglobina (TG) o anti-receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), anticuerpos anti-proteína básica de la mielina o
5 anti-glicoproteína oligodendrocítica de la mielina, anticuerpos IgM del factor reumatoide dirigidos contra la porción Fc de la IgG, anticuerpos anti-Factor VIII de, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto preferido de este método, el anticuerpo se administra no más de aproximadamente una vez cada dos semanas, más preferiblemente una vez al
10 mes, al sujeto.

En otra realización, un segundo medicamento, donde el primer medicamento es el anticuerpo, se administra al sujeto en una cantidad efectiva para tratar al sujeto en los métodos anteriores. Este segundo medicamento es un agente inmunosupresor, preferiblemente, un antagonista que se une a un marcador de la
15 superficie de las células B, un antagonista de BAFF, un fármaco anti-reumático que modifica una enfermedad (DMARD), un antagonista de integrina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un antagonista de citocinas, o una combinación de los mismos. Además, éste puede ser una glicoproteína hialuronidasa como un vehículo de distribución activa. Más preferiblemente éste
20 es DMARD o metotrexato.

En otra realización, el sujeto nunca ha sido previamente tratado con un medicamento para el trastorno. En otro aspecto, el sujeto nunca ha sido previamente tratado con un antagonista del TNF.

En una realización alternativa, el sujeto ha sido previamente tratado con un
25 medicamento para el trastorno, preferiblemente con un antagonista del TNF (tal como un anticuerpo anti-TNF o un receptor del TNF-Ig como etanercept) o un DMARD.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de la RA en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un
30 anticuerpo para la presente invención. En este método, preferiblemente el anticuerpo induce una respuesta clínica importante en el sujeto. Más

preferiblemente, el sujeto ha sido tratado con un medicamento para el trastorno, preferiblemente con un antagonista del TNF (tal como un anticuerpo anti-TNF o un receptor del TNF-Ig como etanercept) o un DMARD. En otro aspecto preferido de este método, el anticuerpo se administra no más de aproximadamente una vez
5 cada dos semanas, más preferiblemente una vez al mes, al sujeto.

En otra realización de este método de tratamiento de la RA, un segundo medicamento, donde el anticuerpo es el primer medicamento, se administra al sujeto que está siendo tratado para la RA en una cantidad efectiva. Este segundo medicamento es un agente inmunosupresor, preferiblemente, un antagonista que
10 se une a un marcador de la superficie de las células B, un antagonista del BAFF, un fármaco anti-reumático que modifica una enfermedad (DMARD), un antagonista de la integrina, un antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un antagonista de citocinas, o una combinación de los mismos. Además, puede ser una glicoproteína hialuronidasa como un vehículo de distribución activa. Más
15 preferiblemente éste es un DMARD o metotrexato. Preferiblemente, el anticuerpo utilizado para el tratamiento de la RA se administra por vía subcutánea o intravenosa. Además, puede ser un anticuerpo desnudo o conjugado, por ejemplo, a un agente citotóxico. En otro aspecto preferido de este método, el anticuerpo se administra no más de aproximadamente una vez cada dos
20 semanas, más preferiblemente una vez al mes, al sujeto.

La invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador, tal como un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico aislado anticuerpo de
25 cualquiera de las realizaciones anteriores. También se proporcionan vectores de expresión que incluyen tales ácidos nucleicos y aquellos que codifican los anticuerpos de la invención. También se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo para la invención. Se pueden utilizar cualquiera de una variedad de células hospederas. En una
30 realización, la célula hospedera es una célula procariótica, por ejemplo, *E. coli*. En otra realización, la célula hospedera es una célula eucariota, por ejemplo, una

célula de levadura o una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para hacer un anticuerpo para la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método de fabricación o producción de un anticuerpo anti- LT α (el cual, tal como se define en la presente especificación, incluye la longitud completa y fragmentos del mismo, (siempre y cuando contengan una región Fc), dicho método que comprende cultivar una célula hospedera apropiada que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo para la invención (preferiblemente que comprende un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), bajo condiciones para producir el anticuerpo, y recuperar dicho anticuerpo. El anticuerpo puede ser recuperado a partir de la célula hospedera o del cultivo de las células hospederas. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En otra realización preferida, el anticuerpo se conjuga con otra molécula, la otra molécula siendo preferiblemente un agente citotóxico.

Otro aspecto de la invención es un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en él, la composición que comprende un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriores y un prospecto, el cual indica que la composición puede ser utilizada para tratar la indicación para la cual el anticuerpo está destinado, tal como un trastorno autoinmune. Un segundo medicamento, como se señaló anteriormente, puede añadirse a este tipo de artículo, por ejemplo, en un recipiente separado, además del anticuerpo, que es el primer medicamento.

En otro aspecto, la invención comprende un hibridoma depositado en la ATCC el 19 de abril de 2006 bajo el número de Depósito 7538-PTA. Además se proporciona un anticuerpo secretado por un hibridoma.

Si la enfermedad autoinmune es la RA especialmente, uno de los aspectos es un método donde al paciente nunca se le ha administrado un medicamento para la RA. Otro aspecto es un método donde al paciente le ha sido administrado previamente al menos un medicamento para la RA, más preferiblemente donde el paciente no es sensible a al menos un medicamento que le ha sido administrado previamente. El medicamento administrado previamente o los medicamento a los

cuales el paciente puede no ser sensible, incluyen un agente inmunosupresor, antagonista de citocinas, antagonista de la integrina, corticosteroides, analgésicos, DMARD, NSAID, o antagonista de CD20, y más preferiblemente un agente inmunosupresor, antagonista de citocinas, antagonista de integrina, corticosteroides, DMARD, NSAID, o antagonista de CD20, como un anticuerpo para CD20, el cual es preferiblemente no rituximab o un 2H7humanizado. Más preferiblemente, tales medicamento(s) previamente(s) administrados son un DMARD o un inhibidor del TNF, tales como un anticuerpo anti-TNF-alfa o TNF-Ig.

En otro aspecto preferido de la invención para usar los anticuerpos de la presente especificación para tratar una enfermedad autoinmune tal como la RA, el paciente ha exhibido una respuesta inadecuada a uno o más inhibidores del TNF o a uno o más DMARDs. Más preferiblemente, la RA es RA incipiente o RA temprana.

En otra realización, se proporciona un método donde al menos aproximadamente tres meses después de la administración del anticuerpo para la presente especificación a un paciente con artritis reumatoide o daño articular, una prueba de imagen es dada que mide una reducción del daño articular en el hueso o tejido blando, en comparación con la línea base antes de la administración, y la cantidad del anticuerpo administrado es efectiva en lograr una reducción en el daño articular. En un aspecto preferido, la prueba mide el índice total de Sharp modificado. En un aspecto preferido, el método comprende además la administración adicional al paciente del anticuerpo para la presente especificación, en una cantidad efectiva para lograr una reducción mantenida o continuada en el daño articular en comparación con el efecto de la administración previa de un anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo para la presente especificación administra adicionalmente al paciente, incluso si no hay mejoría clínica en el paciente en el momento de la prueba después de una administración previa. La mejoría clínica preferiblemente es determinada por la evaluación del número de articulaciones sensibles o inflamadas, conduciendo una evaluación clínica global del paciente, evaluando la velocidad de sedimentación eritrocítica, evaluando la cantidad de proteína C-reactiva, o utilizando medidas de los compuestos de actividad de la enfermedad.

Los segundos medicamentos preferidos para el tratamiento de la RA y el daño articular incluyen un agente inmunosupresor, un DMARD, un agente para el control del dolor, un antagonista de la integrina, un NSAID, un antagonista de citocinas, un bifosfonato, un antagonista de un marcador de superficie de las células B, tal como por ejemplo, BR3-Fc, anticuerpo para BR3, anticuerpo para anticuerpo para CD20, anticuerpo para CD40, anticuerpo para CD22, anticuerpo para CD23, o una combinación de los mismos. Si el segundo medicamento es un DMARD, preferiblemente éste se selecciona a partir del grupo que consiste de auranofina, cloroquina, D-penicilamina, oro inyectable, oro oral, hidroxiclороquina, sulfasalazina, miocrisina, y metotrexato. Si el segundo medicamento es un NSAID, éste preferiblemente se selecciona a partir del grupo que consiste de: fenbufen, naprosyn, diclofenac, etodolac, indometacina, ibuprofeno y aspirina. Si el segundo medicamento es un agente inmunosupresor, éste es preferiblemente seleccionado a partir del grupo consistente de etanercept, infliximab, adalimumab, leflunomida, anakinra, azatioprina y ciclofosfamida. Otros grupos de segundos medicamentos preferidos incluyen anti-alfa4, etanercept, infliximab, etanercept, adalimumab, kinaret, efalizumab, osteoprotegerina (OPG), activador anti-receptor del ligando NFkB (anti-RANKL), activador anti-receptor de NFkB -Fc (RANK-Fc), pamidronato, alendronato, actonel, zolendronato, clodronato, metotrexato, azulfidina, hidroxiclороquina, doxiciclina, leflunomida, sulfasalazina (SSZ), prednisolona, antagonista del receptor de la interleucina-1, prednisona o metilprednisolona. Otro grupo preferido de segundos medicamentos incluye infliximab, la combinación infliximab/metotrexato (MTX), MTX, etanercept, un corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, auranofina, hidroxiclороquina (HCQ), combinación de prednisolona, MTX y SSZ, combinaciones de MTX, SSZ, y HCQ, la combinación de ciclofosfamida, azatioprina, y HCQ, y la combinación de adalimumab con MTX. Más preferiblemente, el corticosteroide es prednisona, prednisolona, metilprednisolona, hidrocortisona, o dexametasona. En otra realización preferida, el segundo medicamento es MTX, el cual es más preferiblemente administrado por vía peroral o parenteral.

En otro aspecto, los métodos de tratamiento en la presente especificación además comprenden volver a tratar al paciente mediante la re-administración al paciente de una cantidad efectiva de los anticuerpos, de la presente

especificación. Preferiblemente, el nuevo tratamiento se comienza en al menos 24 semanas después de la primera administración del anticuerpo. En otra realización, un segundo re-tratamiento es comenzado a al menos aproximadamente 24 semanas después de la segunda administración del anticuerpo. En otra realización, donde la enfermedad autoinmune es RA, el daño articular se ha reducido después de la repetición del tratamiento. En una realización alternativa, no se observa mejoría clínica en el paciente en el momento de la prueba después de la repetición del tratamiento, especialmente cuando la mejoría clínica se determina mediante la evaluación del número de articulaciones inflamadas y sensibles, conduciendo a una evaluación clínica global del paciente, evaluando la velocidad de sedimentación eritrocítica, evaluando la cantidad de proteína C-reactiva, o utilizando medidas de los compuestos de actividad de la enfermedad.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de promover un anticuerpo para la especificación o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende promover, a un público objetivo, el uso del anticuerpo o la composición farmacéutica del mismo, para tratar a un paciente o una población de pacientes que exhiben una enfermedad autoinmune, tal como artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, o IBD.

En otro aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende, empaquetados juntos, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo para la presente especificación y un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que indica que el anticuerpo o la composición farmacéutica es indicada para tratar pacientes con una enfermedad autoinmune, tal como artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, o IBD. En una realización preferida, el artículo además comprende un recipiente que comprende un segundo medicamento, donde el anticuerpo es el primer medicamento, que comprende además instrucciones en el prospecto para tratar al paciente con una cantidad efectiva del segundo medicamento, el cual es preferiblemente metotrexato.

En aún otro aspecto adicional, la invención comprende un método para empacar un anticuerpo para la especificación o una composición farmacéutica del

anticuerpo, que comprende combinar en un paquete el anticuerpo o la composición farmacéutica del anticuerpo y una etiqueta que indica que el anticuerpo o la composición farmacéutica es indicada para tratar pacientes que exhiben una enfermedad autoinmune tal como RA, MS, lupus o IBD.

5 BREVE ESPECIFICACIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1A representa las secuencias de longitud completa para la quimera 2C8 de las cadenas pesada y ligera (ID SEC NOS: 32 y 33, respectivamente).

La FIG. 1B representa las secuencias de longitud completa para la quimera 3F12 de las cadenas pesada y ligera (ID SEC NOS: 34 y 35, respectivamente), así
10 como la quimera 3F12 de la variable región de la cadena pesada (ID SEC NO: 31).

La FIG. 1C representa la secuencia de la región variable de la cadena ligera para una quimera 3F12 mejorada (referida como quimera2 en los ejemplos a continuación) (3F12.2D3) (ID SEC NO: 36) y la secuencia de la región constante
15 de la cadena ligera 3F12.2 D3 (ID SEC NO: 37). La negrilla de los residuos indica aquellos identificados a partir de diversas escisiones químicas o enzimáticas.

La FIG.1D representa la secuencia de la región variable de la cadena pesada para una quimera 3F12 mejorada (3F12.2D3) (ID SEC NO: 38) y la secuencia de la región constante de la cadena pesada 3F12.2D3 (ID SEC NO: 39 La negrilla de
20 los residuos indica aquellos identificados a partir de diversas escisiones químicas o enzimáticas, y el asterisco indica un sitio de glicosilación.

La FIG. 2A representa el alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable para los siguientes: anticuerpo 2C8 quimérico (ID SEC NO: 23), humanizado 2C8.v2 (ID SEC NO: 24), y secuencia consenso del subgrupo I kappa (ID SEC
25 NO: 40). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

La FIG. 2B muestra el alineamiento de secuencias de la cadena pesada variable para los siguientes: anticuerpo 2C8 quimérico (ID SEC NO: 25), humanizado 2C8.v2 (ID SEC NO: 26), y secuencia consenso del subgrupo III humano (ID SEC
30 NO: 41). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los

asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

La FIG. 2C representa las secuencias de las cadenas pesada y ligera para las versiones 2C8.v7 and 2C8.v12 (ID SEC NOS: 42-45).

5 La FIG. 3A representa el alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable de lo siguiente: anticuerpo 3F12 quimérico (ID SEC NO: 27), humanizado 3F12.v5 (ID SEC NO: 28), y la secuencia consenso del subgrupo I kappa (ID SEC NO: 40). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las
10 secuencias alineadas.

La FIG. 3B representa el alineamiento de secuencias de la cadena pesada variable de lo siguiente: anticuerpo 3F12 quimérico original (no 3F12.2D3) (ID SEC NO: 29), humanizado 3F12.v5 (ID SEC NO: 30), y la secuencia consenso en el subgrupo III humano (ID SEC NO: 41). Las secuencias de cada CDR se
15 muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

Las FIGs. 4A y 4B muestran que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino 5H3 inhibe la artritis inducida por anticuerpos (AIA). La Figura 4A muestra los resultados del uso preventivo del anticuerpos anti-LT α en comparación a una
20 mutación DANA del Fc (anti-LT.Fcmutant) y un mutante TNFRII.Fc (una inmunoadhesina TNFR.Ig) así como un control de isotipo (anticuerpo monoclonal anti-ambrosía IgG2a). La Figura 4B muestra que el anticuerpo anti-LT α inhibió el desarrollo de la artritis en un modelo de AIA cuando se administra terapéuticamente, en comparación con el control de isotipo y el mutante
25 TNFRII.Fc.

Las FIGs. 5A y 5B muestran que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 inhibe la artritis inducida por colágeno (CIA). La Figura 5A muestra que S5H3 inhibió la artritis en un modelo preventivo de CIA, en comparación a una
mutación DANA del Fc (anti-mutante LT.Fc) así como un control de isotipo
30 (anticuerpo monoclonal anti-ambrosía IgG2a) y fue comparable a un mutante TNFRII.Fc. Figura 5B muestra que el anticuerpos anti-LT α S5H3 inhibió el

desarrollo de la artritis en un modelo de CIA cuando se administra terapéuticamente, en comparación con el control de isotipo, y fue comparable al mutante TNFRII.Fc.

La FIG. 6 muestra que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 retrasa la aparición y la gravedad de la enfermedad EAE en ratones MBP-TCR transgénicos, en comparación a un control de isotipo (anticuerpo monoclonal IgG1 anti-gp120).

Las FIGs. 7A, 7B y 7C muestran que el tratamiento con el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 no afecta las respuestas dependientes de células T IgM anti-TNP, IgG1 e IgG2a, respectivamente, en comparación con el control de isotipo (anti-ambrosía), el mutante anti-LT.Fc, y CTLA4.Fc (un control positivo).

La FIG. 8 muestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 no afecta las respuestas de anticuerpos independiente de las células T (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3), en comparación con el control de isotipo (anti-ambrosía) y el mutante TNFRII.Fc.

La FIG. 9 muestra que la contra el anticuerpo monoclonal quimérico anti-LT α 2C8 evita GVHD en ratones con SCID humano, en comparación con el mutante anti-LT α 2C8 Fc DANA y el control de isotipo (trastuzumab, IgG1 humana). El mutante CTLA4.Fc también se utilizó como un control positivo.

La FIG. 10A muestra que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 se unen a la LT α 3 humana.

La FIG. 10B muestra que anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 así como el mutante anti-LT.Fc se unen a la LT α 3 murino.

La FIG. 11A muestra, a través de un ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA), los resultados de que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 se une al complejo LT α 1 β 2 murino, al igual que el mutante anti-LT.Fc.

La FIG. 11B muestra los resultados del ensayo FACS para la unión de los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 a la LT α en la superficie de las células humanas formando complejos con LT β . Ellos se comparan con LT β -receptor.hulG1 y el control de isotipo hulGI (trastuzumab).

La FIG. 11C muestra los resultados del ensayo FACS para la unión del anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 a la LT α en la superficie de las células murinas formando complejos con LT β . Este se compara con la IgG2a murina para el receptor de LT β , el mutante anti-LT S5H3 Fc, y el control de isotipo (anti-IL 122
5 mulgG2a).

Las FIG. 12A y 12B muestran que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 se unen a las células Th1 y Th2 humanas, respectivamente, y muestran los resultados de unión de LTbR.Fc, TNFRII.Fc, del control de isotipo para la comparación.

10 Las FIGs. 12C-12E muestran que el anticuerpo anti-LT α humanizado 2C8.vX no se une a las células en reposo (FIG. 12C), pero si se une a las células Th1 y Th17 (FIG. 12D y E, respectivamente), con una comparación de su unión con la del control de isotipo.

La FIG. 13A, muestra las células T inactivadas, tratados con LTbR.Fc (línea
15 sólida), el anticuerpo anti-LT α 3F12 quimérico (línea discontinua), y el control de isotipo (área sombreada).

La FIG. 13B, muestra las células T CD4 activadas con anti-CD3 y anti-CD28, tratadas con los reactivos de la Fig. 13 A.

La FIG. 13C, muestra las células T CD8 activadas con anti-CD3 y anti-CD28,
20 tratadas con los reactivos de la Fig. 13 A.

La FIG. 13D muestra las células NK CD56 activadas con IL15, tratadas con los reactivos de la Fig. 13 A.

La FIG. 13E muestra las células B CDL 9 activadas con IgM y CD40L, tratadas con los reactivos de la Fig. 13 A.

25 La FIG. 14A muestra que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 bloquean funcionalmente la LT α 3 humana en comparación con el control de isotipo (trastuzumab).

La FIG. 14B muestra que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 y el mutante anti-LT.Fc bloquean funcionalmente la LT α 3 murina en comparación
30 con el control de isotipo (trastuzumab).

La FIG. 14C muestra que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 bloquean la LT α 3 inducida por IL-8 en células A549 en comparación con el control de isotipo (trastuzumab).

FIG. 14D muestra que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12, así como el mutante TNFRII.Fc, bloquean la expresión de ICAM inducida por LT α 3 en células HUVEC en comparación con el control de isotipo (trastuzumab). La respuesta de las células no estimuladas también se muestra.

La FIG. 14E muestra que el anticuerpo anti-LT α quimérico 2C8 bloquea la activación de NFkB inducida por LT α 3, en comparación con el control de isotipo. La respuesta de las células no estimuladas también se muestra.

La FIG. 15A muestra que el anticuerpo anti-LT α quimérico 2C8 bloquea funcionalmente la activación de NFkB inducida por LT α 1 β 2 en comparación con el control de isotipo. La respuesta de las células no estimuladas también se muestra.

Las FIGs. 15B, 15C, 15D muestran que el anticuerpo anti-LT α quimérico 2C8 bloquea, la citotoxicidad inducida por LT α 3, LT α 2 β 1 y LT α 1 β 2, respectivamente.

La FIG. 15E muestra que los anticuerpos anti-LT α quiméricos 2C8 y 3F12 bloquean la expresión de ICAM inducida por LT α 1 β 2 en células HUVEC en comparación con el control de isotipo (trastuzumab). La respuesta de las células no estimuladas también se muestra.

La FIG. 16 muestra que el anticuerpo anti-LT α quimérico 2C8 puede matar las células que expresan LT α β en comparación con el mutante anti-LT α 2C8 Fc.

Las FIGs. 17A-H muestran que el anticuerpo anti-LT α quimérico 2C8 bloquea la secreción de citocinas y quimioquinas en las células HUVEC, con las figuras 17A-17D, mostrando respectivamente, KC/IL-8, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 1 β 2, y las figuras 17E-17H, mostrando respectivamente, KC/IL-8, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 3 en comparación con el control.

Las FIGs. 17I-P muestran que el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-murino S5H3 bloquea la secreción de citocinas y quimioquinas en las células 3T3, con las figuras 17I-17L, mostrando respectivamente, KC, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 1 β 2 y las figuras 17M-17P, mostrando respectivamente KC, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 3 en comparación con el control.

La FIG. 18A representa el alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable para lo siguiente: anticuerpo 2C8 quimérico (ID SEC NO: 23), humanizado 2C8.vX (ID SEC NO: 102), y la secuencia consenso del subgrupo I kappa (ID SEC NO: 40). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los
5 residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

La FIG. 18B muestra el alineamiento de secuencias de la cadena pesada variable para los siguientes: anticuerpo 2C8quimérico (ID SEC NO: 25), humanizado 2C8.vX (ID SEC NO: 103), y la secuencia consenso del subgrupo III humano (ID
10 SEC NO: 41). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

Las FIGs. 19A y 19B muestran, respectivamente, las pruebas ELISA de los anticuerpos 2C8.vX para la unión a LTα3 y LTα1β2 en comparación con
15 TNFRII.Fc/control de isotipo.

Las FIGs. 20A y 20B muestran, respectivamente, el bloqueo de LTα3 y LTα1β2 humanas por los anticuerpos 2C8.vX en comparación con el control de isotipo/TNFRII.Fc, usando un ensayo para la prueba de bloqueo de la citotoxicidad inducida por LT humana.

20 La FIG. 21 proporciona una comparación de cómo las diferentes moléculas bloquearon la LTα3 en un ensayo funcional que muestra la inhibición de la regulación hacia abajo de ICAM1 por LTα3 en células HUVEC. Específicamente, el isotipo, 2C8.vX y TNFRII.Fc se compararon.

La FIG. 22 proporciona una comparación de cómo las diferentes moléculas
25 bloquearon la LTα1β2 en un ensayo funcional que muestra el bloqueo LTα1β2 utilizando células 293-LTβR. Específicamente, el isotipo y 2C8.vX se compararon junto con las células no estimuladas.

La FIG. 23 muestra la actividad ADCC de 2C8.vX usando un protocolo que involucra células 293-LTα1β2. 2C8.vX se comparó con el mutante 2C8.vX DANA
30 (mutante de Fc) y con el control de isotipo.

La FIG. 24 muestra los resultados de supervivencia de GVHD con 2C8.vX y CTLA4-Fc, en comparación con los controles (DANA 2C8.vX mutante de Fc y el control de isotipo), en un modelo de SCID humana.

Las FIGs. 25A-D muestran que el anticuerpo 2C8.vX depleta las células T y B que expresan LT α 1 β 2 en el modelo GVHD SCID humano. Los resultados en la FIG. 25A muestran las células humanas positivas totales en el día 2 para el control de isotipo, 2C8.vX, y el mutante 2C8.vX.DANA. Las FIGs. 25B-D muestra los resultados de la activación periódica usando los anticuerpos CD4, CD8, y CD19, respectivamente.

10 FIG. 26A representa el alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable de lo siguiente: anticuerpo 3F12quimérico (ID SEC NO: 27), humanizado 3F12.v14 (ID SEC NO: 108), y la secuencia consenso del subgrupo I kappa (ID SEC NO: 40). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de
15 aminoácidos en las secuencias alineadas.

La FIG. 26B muestra el alineamiento de secuencias de la cadena pesada variable para los siguientes: anticuerpo 3F12quimérico (ID SEC NO: 29), humanizado 3F12.v14 (ID SEC NO: 109), y la secuencia consenso del subgrupo III humano (ID SEC NO: 41). Las secuencias de cada CDR se muestran entre corchetes y los
20 asteriscos se utilizan para mostrar las diferencias entre los residuos de aminoácidos en las secuencias alineadas.

FIG. 27 muestra la actividad ADCC de 2C8.vX y su contraparte afucosilada, donde AF = anticuerpos afucosilado y WT = anticuerpos de producción regular por la línea celular CHO.

ESPECIFICACIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, salvo indicación en contrario, las técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas de recombina-
5 recombina- ción), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales están dentro de las habilidades en el arte. Dichas técnicas se explican plenamente en la literatura, tal como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook y otros, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987), *Methods in Enzimology*
10 (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel y otros, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis y otros, ed., 1994); *A practical Guide to Molecular Cloning* (Perbal Bernard V., 1988); *Phage Display: A Laboratory Manual* (Barbas y otros, 2001).

Definiciones

- 15 "Linfotoxina- α " o "LT α " se define en la presente especificación como un polipéptido biológicamente activo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIG. 2A de la Pat. No. US 5,824,509. La LT α se define específicamente para excluir al TNF α humano o sus análogos naturales de animales (Pennica y otros, *Nature* 312:20/27: 724-729 (1984) y Aggarwal y otros.
20 *J. Biol Chem.* 260: 2345-2354 (1985)). LT α se define específicamente para excluir la LT β humana, tal como se define, por ejemplo, en US 5,661,004.

"Linfotoxina- α 3 trimérica" o "LT α 3" se refiere a un homotrímero de monómeros de LT α . Este homotrímero está anclado a la superficie celular por los dominios citoplásmico y de transmembrana LT β .

- 25 "Linfotoxina- $\alpha\beta$ " o "LT $\alpha\beta$ " o "complejo LT $\alpha\beta$ " se refiere a un heterotrímero de LT α con LT β . Estos heterotrímeros contienen ya bien, o dos subunidades de LT α y una subunidad de LT β (LT α 2 β 1) o una subunidad de LT α y dos de LT β (LT α 1 β 2).

- "Receptor del factor de necrosis tumoral-I" o "TNFR I" y "receptor del factor de necrosis tumoral-II" o "TNFR II" se refieren a los receptores del TNF para el
30 homotrímero LT α 3, también conocidos como p55 y p75, respectivamente.

El "receptor de la Linfotóxina β " o "LT β -R" se refiere a los receptores a los cuales los heterotrómeros LT $\alpha\beta$ se unen.

"Citocinas reguladoras" son citocinas cuyos niveles anormales indican la presencia de un trastorno autoinmune en un paciente. Esas citocinas incluyen, por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, BlyS/April, el TGF- α , TGF- β , interferón- α (IFN- α), IFN- β , IFN- γ , MIP-I, MIF, MCP-I, M-CSF o G-CSF, una linfotóxina, LIGHT, 4 ligando de IBB, ligando de CD27, ligando de CD30, ligando de CD40, ligando de Fas, ligando de GITR, ligando de OX40, ligando de RNAK, THANK, TRAIL, TWEAK y VEG1. Este grupo incluye a miembros de la familia del TNF, los cuales incluyen pero no están limitados a, TNF- α , LTs tales como LT α , LT β , y LIGHT. Para una revisión de la superfamilia del TNF, véase MacEwan, Br. J. Pharmacology 135: 855-875 (2002). Preferiblemente, la citocina reguladora es una IL, tal como IL-1b o IL-6 y/o un miembro de la familia del TNF.

"Citocinas inflamatorias asociadas a la artritis reumatoide" se refieren a la IL-6, IL-1b, y el TNF α , asociados con la patología de RA, los cuales pueden ser inhibidos sistemáticamente y en las articulaciones, o en un ensayo de artritis inducida por colágeno *in vitro*.

Las "células que expresan LT $\alpha\beta$ " son células que expresan o secretan los heterotrómeros LT $\alpha\beta$.

La expresión "modula las células que expresan LT $\alpha\beta$ " se refiere a la depleción o alteración de las proteínas hechas por las células, tales como citocinas, quimiocinas, o factores de crecimiento, con las células que incluyen, por ejemplo, monocitos, células dendríticas, células T y células B.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, de longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando ellos exhiban la actividad biológica deseada), y puede también incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se

describe en mayor detalle en la presente especificación). Puede ser un anticuerpo quimérico, humano, humanizado, y/o de afinidad madura.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden solamente una porción de un anticuerpo intacto, donde la porción preferiblemente retiene, al menos una, más
5 preferiblemente la mayoría o la totalidad de las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende
10 la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas que normalmente se asocian con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC, y la unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente
15 similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento. En una realización, un anticuerpo para la invención es un anticuerpo de un solo brazo, tal como se describe en WO 2005/063816, por ejemplo, un anticuerpo que comprende mutaciones en Fc que
20 constituyen "protuberancias" y "agujeros". Por ejemplo, una mutación de agujero puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc, y una mutación de cavidad puede ser T366W. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab, F(ab')₂, y los fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos
25 formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

A los efectos de la presente especificación, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables ligero y pesado así como una región Fc.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente especificación se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de
30 anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos a excepción de las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos

monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un
5 único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en la medida en que pueden ser sintetizados sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se requiere la producción de los anticuerpos por algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la
10 presente invención pueden ser preparados por la metodología de los hibridomas descrita por primera vez por Köhler y otros, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden ser hechos usando métodos de ADN recombinante en, por ejemplo, células de bacterias, de eucariotas no animales, de animales, o de plantas (véase, por ejemplo, US 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser
15 aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos, utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, y Clackson y otros, *Nature*, 352:624 - 628 (1991) y Marks y otros., *J. Mol Biol.*, 222:581 -597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales de la presente especificación incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la pesada
20 y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondiente en anticuerpos derivados a partir de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados a partir de otra especie o perteneciente a otra clase o
25 subclase de anticuerpos, así como tales como fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando que exhiban la actividad biológica deseada (US 4,816,567; Morrison y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los métodos de hacer los anticuerpos quiméricos son conocidos en el arte.

Las "formas humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos),
30 son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab, F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígenos) que contienen secuencias mínimas derivadas

de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en las cuales los residuos provenientes de una CDR del receptor son reemplazados por los residuos provenientes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad del anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de Fv FR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante en las secuencias de los marcos o los CDR importados. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar aún más el rendimiento de anticuerpos. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y típicamente dos, en los cuales todos, o sustancialmente todos, los lazos hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todos, o sustancialmente todos, los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones Fr pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en el FR es típicamente no mayor de seis en la cadena H y no mayor de tres en la cadena L. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) típicamente de una inmunoglobulina, humana. Para más detalles, véase Jones y cols., *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann y cols., *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Véanse también Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Trans.* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED® donde la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva a partir de un anticuerpo producido, por ejemplo, mediante inmunogenización de monos macacos con el antígeno de interés. Los métodos de hacer los anticuerpos humanizados son conocidos en el arte.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha hecho

utilizando cualquiera de las técnicas para hacer anticuerpos humanos según lo divulgado en la presente especificación. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos también pueden ser
5 producidos utilizando diferentes técnicas conocidas en el arte, incluyendo las bibliotecas de exposición en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991), Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales, los métodos descritos en Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985);
10 Boerner y otros, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991).

Un anticuerpo de "afinidad madura" es un anticuerpo con una o más alteraciones en uno o más CDRs que resulta en una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones(s). Anticuerpos de afinidad madura preferidos tendrán
15 afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madura son producidos por los procedimientos conocidos en el arte. Marks y otros, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración afinidad mediante el barajado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de la CDR y/o la región del marco se
20 describen en: Barbas y otros., *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-13 (1994), Schier y otros., *Gene*, 169:147-55 (1995), Yelton y otros., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson y otros., *J. Immunol.*, 154(7):3310-19 (1995) y Hawkins y otros., *J. Mol. Biol.*, 226:889-96 (1992).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al cual un anticuerpo puede unirse
25 selectivamente. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácidos nucleico, lípido, hapteno, u otro compuesto de origen natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido. Un "marco aceptor humano", para los fines de la presente especificación, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VL o VH derivado de un marco de
30 inmunoglobulina humana, o de un marco consenso humano. Un marco aceptor humano "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o

puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistente. Cuando están presentes los cambios en la secuencia de aminoácidos preexistente, preferiblemente no más de cinco, más preferiblemente cuatro o menos, y aún más preferiblemente tres o menos, los cambios de los aminoácidos pre-existentes
5 están presentes. Cuando los cambios de los aminoácidos pre-existentes están presentes en un VH, preferiblemente los cambios son sólo en tres, dos, o una de las posiciones 71, 73 y 78, por ejemplo, los residuos de histidina en esas posiciones pueden ser residuos de alanina. En una realización, el marco aceptor humano VL es idéntico en secuencia a la secuencia VL del marco de la
10 inmunoglobulina humana o a la secuencia del marco consenso humano.

Un "marco consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos que se encuentran más comúnmente en una selección de secuencias de los marcos VL o VH de las inmunoglobulina humanas. Generalmente, la selección de las secuencias VL o VH de las inmunoglobulina
15 humanas es a partir de un subgrupo de secuencias de los dominios variables. Típicamente, este subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y otros, supra. En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y otros, supra. En una realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y otros, supra.

20 Un "marco consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat y otros, supra. En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco consenso del subgrupo III de VH comprende, al menos, una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

25 VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (ID SEC NO: 46)-H1-VRQAPGKGLEWVG (ID SEC NO: 47)-H2-FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR (ID SEC NO: 48)-H3-WGQGTLVTVSS (ID SEC NO: 49), donde N es cualquier residuo de aminoácido.

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del marco consenso del
30 subgrupo III de VH comprende, al menos, una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (ID SEC NO: 46)-H1-VRQAPGKGLEWVG (ID SEC NO: 47)-H2-RATFSADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAD (ID SEC NO: 50)-H3-WGQGTLVTVSS (ID SEC NO: 49), donde N es cualquier residuo de aminoácido.

- 5 Un "marco consenso del subgrupo I de VL " comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat y otros, supra. En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco consenso del subgrupo I de VL comprende, al menos, una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:
- 10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (ID SEC NO: 51)-L1-WYQQKPGKAPKLQIY (ID SEC NO: 52)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (ID SEC NO: 53)-L3-FGQGTKVEIKR (ID SEC NO: 54).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del marco consenso del subgrupo I de VL comprende, al menos, una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (ID SEC NO: 51)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (ID SEC NO: 55)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (ID SEC NO: 53)-L3-FGQGTKVEIKR (ID SEC NO: 54).

- El término "región determinante de la complementariedad", o "CDR", cuando se utiliza en la presente especificación, se refiere a las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman lazos estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables, tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). Un número de delineaciones de CDR están en uso y se abarcan en la presente especificación. Los CDRs de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son los más comúnmente utilizados (Kabat y otros, supra). Chotia se refiere en cambio a la ubicación de los lazos estructurales (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre los CDRs de Kabat y los lazos estructurales de Chotia, y son utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las
- 20
- 25
- 30

estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos provenientes de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Lazo	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
----	----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

- 5 Las regiones hipervariables pueden comprender además "regiones hipervariables extendidas" de la manera siguiente: aminoácidos 24-36 (L1), y aminoácidos 46-56 (L2) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2), y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) in el VH. Los residuos de los dominios variables se numeran según Kabat y *otros*, supra para cada una de estas definiciones. A lo largo de la presente especificación y las reivindicaciones, la numeración de los residuos en una
- 10 cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice UE como en Kabat y *otros*, supra. El "índice de UE como en Kabat" se refiere a la numeración de los residuos del anticuerpo IgG1 UE humano.

Un "marco humano no modificado" es un marco que tiene la misma secuencia de

15 aminoácidos que el marco aceptor humano, por ejemplo, que carece de sustitución(s) de aminoácidos no humanos en el marco aceptor humano.

Un "CDR alterado", para los fines de la presente especificación, es un CDR que comprende uno o más (por ejemplo, de una a aproximadamente 16) sustituciones de aminoácido(s) en el mismo.

Un "CDR no modificado", a los fines de la presente especificación, es un CDR que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano a partir del cual él se deriva, es decir, carece de una o más sustituciones de aminoácidos.

Los residuos del "marco" o "FR" son aquellos residuos de los dominios variables
5 distintos de los residuos de los CDR, como se define en la presente especificación.

Un anticuerpo "bloqueador" o "antagonista" es un anticuerpo que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al cual se une. Anticuerpos bloqueadores o anticuerpos antagonistas preferidos son los que inhiben sustancialmente o
10 completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", tal como se utiliza en la presente especificación, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado
15 a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son los materiales que interferirían con los usos terapéuticos o de diagnóstico del anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo
20 determinado por el método de Lowry, y más preferiblemente a más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o,
25 preferiblemente tinción de plata. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes debido a que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará con por lo menos un paso de purificación.

30 El término "numeración del residuo del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat", y las variaciones de

las mismas, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables ligera de la cadena de la compilación de anticuerpos en Kabat, y *otros*, supra. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o
5 más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en un dominio variable de FR o CDR. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuos 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2, y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, *etc.* según Kabat,) después del residuo 82 de FR de la cadena
10 pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede ser determinada para un anticuerpo determinado, mediante alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

Un "polipéptido parental" es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una o más modificaciones de la región Fc-divulgadas
15 en la presente especificación, y que difiere en la función efectora en comparación con un polipéptido variante como se divulga en la presente especificación. El polipéptido parental puede comprender una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con modificaciones en la secuencia de aminoácidos pre-existente (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones).

20 El término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente de manera que extiende desde un residuo de
25 aminoácido en la posición Cys226, o Pro230, al carboxilo-terminal de la misma. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente se compone de dos dominios constante, CH2 y CH3. El último residuo de lisina, en la cadena pesada de la IgG1 puede, pero no tiene que, estar presente como el residuo terminal de la Fc en la proteína madura.

30 El "dominio CH2" de una región Fc de la IgG humana (también denominado dominio "Cy2") se extiende por lo general desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente aminoácido 340. El dominio CH2 es único en el

sentido de que no está estrechamente apareado con otro dominio. Más bien, las dos cadenas ramificadas de carbohidratos enlazadas por N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que los carbohidratos pueden proporcionar un sustituto para el apareamiento
 5 dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161- 206 (1985).

El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C-terminales hasta un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 447 de una
 10 IgG).

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1Q; DC; unión al receptor de Fc; ADCC, fagocitosis; regulación de los receptores de superficie celular (por ejemplo, los receptores de LT), etc. Estas funciones
 15 efectoras generalmente requieren que la región Fc sea combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y pueden ser evaluadas utilizando diversos ensayos como los divulgados en esta especificación, por ejemplo.

Una "región Fc de secuencia nativa" o "región Fc tipo salvaje" comprende una
 20 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc tal como se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencias nativas son conocidas en el arte, e incluyen la región Fc de la IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no-A y A); la región Fc de la IgG2 humana de secuencia nativa; la región Fc de la IgG3 humana de secuencia nativa, y la
 25 región Fc de la IgG4 humana de secuencia nativa, así como las variantes alélicas naturales de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia nativa, en virtud de, al menos, una "modificación de aminoácidos", según se define en la presente especificación. Preferiblemente, la
 30 región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez

sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de la presente especificación, preferiblemente posee al menos, aproximadamente 5 el 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, más preferiblemente al menos un 90% de homología con ellas, y más preferiblemente al menos el 95% de homología con ellas.

El término "polipéptido que contiene la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal 10 como un anticuerpo o inmunoadhesina (véanse las definiciones de la presente especificación), que comprende una región Fc.

Los términos "receptor de Fc" y "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG. El FcR preferido es un FcR humano secuencia nativa. En una realización, el FcR es un FcγR que incluye los 15 receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El 20 receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (véase revisión en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). El término incluye alotipos, tales como los alotipos 25 FcγRIIIA: FcγRIIIA-Phe158, FcγRIIIA-Val158, FcγRIIA-R131, y/o FcγRIIA-H131. Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel y otros, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas y otros, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-341 (1995). Otros FcRs, incluidos aquellos que se identificarán en el futuro, que abarcan dentro del término "FcR" de la presente especificación. El 30 término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que se encarga de la transferencia de las IgGs de la madre al feto (Guyer y otros, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y otros, *Eur. J. Immunol.* 24:2429-2434 (1994)).

- La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK, siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva un antígeno y posteriormente o matan o destruyen la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células principales para la mediación de la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión de los FcRs en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en US 5,500,362 ó 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs, siglas en inglés) y las células NK. Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como lo divulgado en Clynes y otros, *PNAS* (US) 95:652-656 (1998).
- Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII, y realizan la función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las PBMCs, células NK, monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos, con las PBMCs y las células NK como las preferidas. Las células efectoras pueden ser aisladas a partir de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, a partir de la sangre o PBMCs, tal y como se describe en la presente especificación.

- La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía del complemento clásica es iniciada por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada), de manera que estén unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del

complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y otros, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

- Un polipéptido con una Fc de IgG variante que tiene "alterada" la afinidad de unión al FcR o la actividad ADCC, es uno que tiene incrementada o disminuida, ya sea la actividad de unión al FcR (FcγR, o FcRn) y/o la actividad ADCC, en comparación con un polipéptido parental o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La Fc variante que exhibe "unión incrementada" a un FcR, se une al menos al FcR con una afinidad mejor que al polipéptido parental. La mejora en la unión comparada con el polipéptido parental puede ser de aproximadamente tres veces, preferiblemente de aproximadamente 5-, 10-, 25-, 50-, 60-, 100-, 150-, 200-, y hasta 500 veces, o aproximadamente del 25% a 1000% de mejora en la unión. El polipéptido variante que "exhibe unión disminuida" a un FcR, se une al menos al FcR con una afinidad menor que a un polipéptido parental. La disminución en la unión en comparación con un polipéptido parental puede ser aproximadamente del 40% o más en la disminución de la unión. Tales variantes de Fc que muestran una unión disminuida a un FcR, pueden tener poca o ninguna unión apreciable a un FcR, por ejemplo, aproximadamente del 0-20% de la unión al FcR en comparación con la región Fc de la IgG de secuencia nativa.
- El polipéptido que tiene una Fc variante que se une a un FcR con una "mejor afinidad" o "mayor afinidad" que un polipéptido parental o un polipéptido que tiene la Fc de la IgG de secuencia nativa o de tipo salvaje, es uno que se une a uno cualquiera o más de los FcRs anteriormente identificados, con sustancialmente mejor afinidad que al polipéptido parental con Fc de secuencia nativa, cuando las cantidades del polipéptido con la región Fc variante y el polipéptido parental en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, el polipéptido de la Fc variante con una afinidad de unión al FcR mejorada puede mostrar desde aproximadamente dos veces hasta aproximadamente 300 veces, preferiblemente, desde aproximadamente tres veces hasta aproximadamente 170 veces, en la mejora de la afinidad de unión al FcR en comparación con el polipéptido parental, donde la afinidad de unión al FcR se determina según se conoce en el arte.

El polipéptido que comprende una región Fc variante que "exhibe ADCC incrementada" o media la ADCC en presencia de células efectoras humanas con más efectividad que un polipéptido que tiene la Fc de la IgG de tipo salvaje, es uno que *in vitro* o *in vivo* es sustancialmente más efectivo en la mediación de la

5 ADCC, cuando las cantidades del polipéptido con la región Fc variante y el polipéptido con la región Fc de tipo salvaje usadas en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Generalmente, tales variantes serán identificadas usando el ensayo de ADCC *in vitro*, como se divulga en la presente especificación, pero otros ensayos o métodos para determinar la actividad ADCC,

10 por ejemplo, en un modelo animal, etc., son contempladas. La variante preferida es desde aproximadamente cinco veces hasta aproximadamente 100 veces, más preferiblemente desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 veces, más efectiva en la mediación de la ADCC que la Fc de tipo salvaje.

Una "modificación de aminoácido" se refiere a un cambio en la secuencia de

15 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada. Las modificaciones ejemplares incluyen la sustitución, la inserción y/o la delección de un aminoácido. La modificación de aminoácidos preferida de la presente especificación es una sustitución.

Una "modificación de aminoácido en" una posición específica, por ejemplo, en la

20 región Fc, se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado, o la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. Por inserción "adyacente a" un residuo determinado se entiende la inserción del mismo dentro de uno a dos residuos. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo especificado.

25 Una "sustitución de aminoácidos" se refiere al reemplazo de al menos uno de los residuos en una secuencia de aminoácidos determinada, con otro residuo de aminoácido "de reemplazo" diferente. El reemplazo del residuo o residuos puede ser "residuos de aminoácidos naturales" (es decir, codificados por el código genético) y seleccionados a partir de grupo que consiste de: alanina (Ala),

30 arginina (Arg); asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu); glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile); leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser),

treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y valina (Val). Preferiblemente, residuo de reemplazo no de cisteína. La sustitución de uno o más residuos de aminoácidos no naturales también comprende en la definición de la sustitución de un aminoácido en esta especificación. Un "residuo de aminoácido no natural" se
5 refiere a residuo distinto de los residuos de aminoácidos naturales listados anteriormente, el cual es capaz de unirse covalentemente a los residuos de aminoácidos(s) adyacentes en una cadena polipeptídica. Ejemplos de residuos de aminoácidos no naturales incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina, y otros residuos de aminoácidos análogos, tales como los descritos en Ellman y
10 otros, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991). Para la generación de tales residuos de aminoácidos no naturales, se puede utilizar los procedimientos de Noren y otros, *Science* 244: 182 (1989) y Ellman y otros, *supra*. Brevemente, estos procedimientos involucran activar químicamente un supresor del ARNt con un residuo de aminoácido no-natural, seguido por la transcripción y traducción *in vitro*
15 del ARN.

El término de sustitución de aminoácido "conservadora" que se utiliza en la presente invención, se refiere a las sustituciones de aminoácidos que sustituyen funcionalmente a aminoácidos equivalentes. Los cambios de aminoácidos conservadores resultan en cambios silentes en la secuencia de aminoácidos del
20 polipéptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de la misma polaridad actúan como equivalentes funcionales y dan lugar a una alteración silente dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. En general, las sustituciones dentro de un grupo se pueden considerar conservadoras con respecto a estructura y función. Sin embargo, el experto artesano reconocerá que la función
25 de un residuo particular, está determinada por su contexto dentro de la estructura tridimensional de la molécula en la cual este se encuentra. Por ejemplo, los residuos Cys se pueden producir en la forma oxidada (disulfuro), la cual es menos polar que la forma reducida (tiol). La porción alifática larga de la cadena lateral de Arg, puede constituir un rasgo crítico de su papel estructural o funcional, y esto
30 puede ser mejor conservado mediante la sustitución de un residuo no polar, en lugar de otro básico. También, será reconocido que las cadenas laterales que contienen grupos aromáticos (Trp, Tyr, y PHE) pueden participar en interacciones iónicas-aromáticas o "catiónicas- π ". En estos casos, la sustitución de una de

estas cadenas laterales con un miembro del grupo polar sin carga o ácido, puede ser conservadora con respecto a la estructura y la función. Residuos, como Pro, Gly, y Cys (en forma de disulfuro) puede tener efectos directos sobre la conformación de la cadena principal y, frecuentemente, pueden no ser sustituidos sin distorsiones estructurales.

Una "inserción de aminoácidos" se refiere a la incorporación de al menos un aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Mientras que la inserción por lo general consiste en la inserción de uno o dos residuos de aminoácidos, la presente solicitud contempla "inserciones de péptidos" más largas, por ejemplo, la inserción de aproximadamente de tres a cinco o incluso hasta diez residuos de aminoácidos. El residuo(s) insertado(s) puede ser de origen natural o no natural según lo divulgado anteriormente.

Una "delección de aminoácido" se refiere a la eliminación de al menos un residuo de aminoácido a partir de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo a las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda edición., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos de aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos en función de las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que tienen influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

La "región bisagra" se define generalmente como el tramo desde Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206 (1985)). Las regiones bisagras de otros isotipos IgG puede ser alineadas con la secuencia de IgG, colocando el primero y el último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre la cadena pesada en las mismas posiciones.

La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de los residuos inmediatamente al C-terminal de la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc.

El "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la vía de la CDC. El C1q humano se pueden adquirir comercialmente a partir de, por ejemplo, Quidel, San Diego, CA.

El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una porción de una cadena polipeptídica del mismo (por ejemplo, la cadena α del mismo) que es responsable de la unión a una región. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena α del FcR.

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que incluye generalmente la región variable o de unión antígeno del anticuerpo intacto o de la región Fc de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al FcR. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de una sola cadena de y anticuerpos multiespecíficos formado a partir de fragmentos de anticuerpos.

Como se usa en la presente especificación, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina) con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de

unión deseada, que es diferente de la del sitio de unión y reconocimiento del antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. El parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que
5 comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG -4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD, o IgM. Por ejemplo, inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos en la presente
10 especificación incluyen los polipéptidos que comprenden las porciones de unión al estimulador de linfocitos B (BLyS) de un receptor BLyS sin las secuencias citoplasmáticas o de transmembrana del receptor BLyS. En una realización, el dominio extracelular de BR3 (receptor 3 de BLyS), TACI (activador de transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando ciclofilina), o BCMA
15 (antígeno de maduración de las células B) se fusiona a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

Un "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una
20 propiedad biológica, como la actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una simple propiedad física o química, tal como la unión a una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos porciones pueden estar enlazadas directamente por un simple enlace peptídico o a través de un péptido lazador que contiene uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, las dos
25 porciones y el enlazador estarán en el marco de lectura unos con otros.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fortaleza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión simple de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente especificación,
30 "afinidad" se refiere a la afinidad intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su pareja Y, generalmente puede ser

- representada mediante su constante de disociación (K_d). Afinidad se puede medir por métodos conocidos en el arte, incluyendo los descritos de la presente especificación. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociar fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. Una variedad de métodos para la medición de la afinidad de unión son conocidos en el arte, y cualquiera de los cuales puede ser utilizado para fines de la presente invención. Realizaciones ilustrativas específicas se describen más adelante.
- 10 Una "constante de asociación" o "tasa de asociación" o " k_{on} " de acuerdo a la invención se puede determinar con la técnica de resonancia plasmón de superficie utilizando un biosensor óptico BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25°C con chips CM5 del antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, los chips
- 15 biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4.8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10
- 20 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Siguiendo la inyección de 1M de etanolamina para bloquear los grupos no reactivos para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas dos veces de Fab (0.78 nM a 500 nM) en solución salina tamponada de fosfato (PBS) con 0.05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a un velocidad de flujo de 25 µl/min aproximadamente. Las tasas de
- 25 asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) acoplando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como el cociente k_{off}/k_{on} . Véase, p.ej., Chen, Y., y otros., *J. Mol. Biol.* 293:865-81 (1999). Sin embargo, si
- 30 la tasa de asociación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, entonces la constante de asociación se determina preferiblemente utilizando una técnica de extinción de la fluorescencia que mide el aumento o la disminución de la intensidad de la emisión

de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25°C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes del antígeno según medición en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitadora.

La "Kd" o el "valor Kd", de acuerdo con esta invención es, en una realización, medido por un ensayo de unión antígeno radiomarcado (RIA), realizado con la versión Fab del anticuerpo y la molécula del antígeno, tal como se describe en el siguiente ensayo que mide afinidad de unión en solución de los Fabs para el antígeno, mediante el equilibrio del Fab con una concentración mínima del antígeno etiquetado (I^{125}) en presencia de una serie de titulación del antígeno no etiquetado, y luego capturando de antígeno no unido con una placa recubierta del anticuerpo anti-Fab (Chen y otros, *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) son recubiertas durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpos anti-Fab atrapador (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6) y, posteriormente, bloqueadas con 2% (w/v) de albúmina sérica bovina en PBS por dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc # 269620), 100 pM o 26 pM del antígeno etiquetado [I^{125}] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (en consonancia con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y otros, *Cancer Res.* 57:4593 - 4599 (1997)). El Fab de interés se incuba entonces durante la noche, sin embargo, la incubación puede continuar por un período más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas son transferidas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente durante una hora. La solución es entonces eliminada y la placa lavada ocho veces con 0,1% de TweenTM- 20 en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo del centellante (MicroScint-20; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT TM (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan igual o inferior al 20% de la unión máxima, son escogidas para su uso en ensayos de de unión competitiva.

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente el/la mismo(a)", tal como se utiliza en la presente especificación, denota un suficientemente alto grado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con un anticuerpo para la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de manera tal que uno con habilidades en el arte consideraría la diferencia entre los dos valores de ser de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, los valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente menor que aproximadamente el 50%, más preferiblemente menor que aproximadamente el 40%, aún más preferiblemente menor que aproximadamente el 30%, aún más preferiblemente menor que aproximadamente el 20%, y más preferiblemente menor que aproximadamente el 10%, como una función del valor del anticuerpo de referencia/comparador.

La frase "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", tal como se utiliza en la presente especificación, denota un suficientemente alto grado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con un anticuerpo para la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de manera tal que uno con habilidades en el arte consideraría la diferencia entre los dos valores de ser de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, los valores de Kd, la respuesta HAMA). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente mayor que aproximadamente el 10%, más preferiblemente mayor que aproximadamente el 20%, aún más preferiblemente mayor que aproximadamente el 30%, aún más preferiblemente mayor que aproximadamente el 40%, y más preferiblemente mayor que aproximadamente el 50%, como una función del valor del anticuerpo de referencia/comparador.

*El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia peptídica o polipeptídica se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que sean idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el

máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento, a los efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, se puede lograr de varias formas que están dentro de las habilidades en el arte, por ejemplo, utilizando programas informáticos de acceso público, tales como los software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en el arte pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que están siendo comparadas. Para los propósitos de la presente especificación, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, perteneciente a Genentech, Inc. El código fuente de ALIGN-2 ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina de Derecho de Autor de los E.U.A., Washington DC, 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derecho de Autor No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc, South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente en la Tabla 1 a continuación. El Programa ALIGN-2 debe ser compilado para su uso en sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A para, con, o contra una determinada secuencia de aminoácidos B (lo cual puede alternativamente ser enunciado como que una secuencia de aminoácidos A determinada tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con, o contra una determinada secuencia de aminoácidos B), se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos punteados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de A y B del programa, donde Y es el número total de los residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos de A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos de B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que específicamente se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente especificación, se obtienen según lo descrito anteriormente, usando el programa de ordenador ALIGN-2.

Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiarían del tratamiento con un anticuerpo o método de la invención, con independencia del mecanismo, pero incluyendo la inhibición o el bloqueo de la acción de LT α 3 o LT α 3 y/o mediante la depleción de las células positivas para LT α . Esta condición, incluye pero no está limitada a, una condición médica o enfermedad mediada por o en relación con la elevada expresión o actividad, o activación anormal de LT α 3 y/o LT α 3 por cualquier célula. Esto incluye trastornos crónicos y agudos, tales como las patologías que predisponen a los mamíferos al trastorno en cuestión.

Un "trastorno autoinmune", en la presente especificación, es una enfermedad o trastorno derivado de y dirigido contra los propios órganos o tejidos de un individuo, o un co-segregado o manifestación del mismo, o el estado general resultante del mismo. En muchos de estos trastornos autoinmunes e inflamatorios, puedan existir una serie de marcadores clínicos y de laboratorio, que incluyen pero no se limitada a, hipergammaglobulinemia, altos niveles de autoanticuerpos, depósitos en los tejidos de complejos antígeno-anticuerpo, beneficio proveniente de los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores, y agregados de células linfoides en los tejidos afectados. Sin limitarse a una teoría cualquiera con respecto al trastorno autoinmune mediado por células B, se cree que las células B demuestran un efecto patógeno en enfermedades autoinmunes humanas a través de una multitud de vías de mecanismos, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes, activación de células T y dendríticas, la síntesis de citocinas,

liberación directa de quimioquinas, y la provisión de un nido para la neolinfogénesis ectópica. Cada una de estas vías puede participar, a diferentes grados, en la patología de las enfermedades autoinmunes.

Como se usa en la presente especificación, un "trastorno autoinmune" puede ser una enfermedad de un órgano específico (es decir, la respuesta inmune se dirige específicamente contra un órgano del sistema, tales como de los sistemas endocrino, hematopoyético, de la piel, cardiopulmonar, gastrointestinal y hepático, renal, de la tiroides, de los oídos, neuromuscular, sistema nervioso central, *etc.*) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples órganos y sistemas (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE, siglas en inglés), artritis reumatoide, polimiositis, *etc.*) Tales enfermedades preferidas incluyen los trastornos reumatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus, tales como el SLE y la nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de los anticuerpos antifosfolípidos, y artritis psoriática), trastornos autoinmunes gastrointestinales y hepáticos (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y la anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y la enfermedad celíaca), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis negativa para ANCA y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, y poliangiitis microscópicas), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, la esclerosis múltiple (ME, siglas en inglés), el síndrome opsoclonus mioclonus, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pénfigo vulgar, penfigoide buloso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura post-transfusión, y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de la audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de

órganos, y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, la diabetes relacionada con enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM, siglas en inglés), la enfermedad de Addison, y enfermedades autoinmunes de la tiroides (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Este tipo de enfermedades incluyen más preferiblemente, por ejemplo, RA, IBD, incluyendo la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple (MS, siglas en inglés), síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis, y glomerulonefritis. Aún más preferidas son RA, IBD, lupus, y MS, y más preferidas la RA y la IBD, y la más preferida la RA.

Ejemplos específicos de otros trastornos autoinmunes, tal como se define en la presente especificación, y que en algunos casos abarcan los ya citados, incluyen, pero no se limitan a, la artritis (aguda y crónica, la artritis reumatoide de aparición juvenil incluyendo la artritis reumatoide y estados tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, enfermedad de Still, artritis vertebral, artrosis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartitis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por agotamiento de estrógenos y espondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), enfermedad linfoproliferativa autoinmune, enfermedades hiperproliferativas inflamatorias de la piel, psoriasis, tales como placa psoriática, psoriasis gutatta, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, enfermedades atópicas incluyendo atopía, tales como la fiebre del heno y el síndrome de Job, dermatitis incluyendo dermatitis por contacto, dermatitis por contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis por contacto irritativa, y dermatitis atópica, síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria alérgica, tales como urticaria crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria crónica autoinmune, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (ME) tal como MS-

óptico-espinal, MS progresiva primaria (PPMS), y MS remitente recurrente (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades

5 gastrointestinales autoinmunes, inflamación gastrointestinal, colitis, tales como colitis ulcerosa, colitis ulcerativa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, y colitis transmural, y enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de distrés respiratorio,

10 incluyendo síndrome de distrés respiratorio agudo o del adulto (ARDS), meningitis, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno autoinmune hematológico, enfermedad del injerto contra el huésped, angioedema, tal como angioedema hereditario, daño en los nervios craneales como en la meningitis, herpes gestacional o penfigoide gestacional, penfigoide

15 gestacional, prurito del escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, pérdida repentina de audición debido a una condición autoinmune, enfermedades mediadas por IgE, tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen, y encefalitis límbica y/o encefalitis del tronco cerebral, uveítis, tales como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis

20 granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior, o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tales como glomerulonefritis crónica o aguda, tal como GN primaria, GN mediada por el sistema inmune, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN proliferativa membrano- o

25 membranosa (MPGN), incluyendo las de tipo I y tipo II, y GN rápidamente progresiva (RPGN), nefritis proliferativa, fallo endocrino poliglandular autoinmune, balanitis incluyendo balanitis circumscripción plasmacelularis, balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discrómico Perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen

30 espinuloso, liquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenoso, condiciones y respuestas alérgicas, alergias a los alimentos, alergia a fármacos, alergias a insectos, trastornos alérgicos raros, tales como mastocitosis, reacción alérgica o eczema alérgico

incluyendo eczema atópico, eccema seco o eczema asteatótico, eczema dishidrótico, y eczema palmoplantar vesicular, asma tal como asma bronquial, asma autoinmune, condiciones que involucran la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmune contra los antígenos foráneos, tales como los grupos sanguíneos A-B-O del feto durante el embarazo, enfermedad inflamatoria crónica pulmonar, miocarditis autoinmune, deficiencia de la adhesión leucocitaria, lupus, incluyendo nefritis lúpica, lupus cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra-renal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus alopecico, SLE, tal como SLE cutáneo o SLE subagudo cutáneo, 5 síndrome de lupus neonatal (NLE), y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de aparición juvenil (tipo I), incluyendo IDDM pediátrica, diabetes mellitus de aparición en el adulto (diabetes de tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, colitis diabética, trastorno diabético de las grandes arterias, respuestas inmunes asociadas con la 15 hipersensibilidad retardada y aguda mediadas por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de los grandes vasos, tales como polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de los vasos medianos tales como la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa, inmunovasculitis, vasculitis del CNS (siglas en inglés), vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante tales como vasculitis necrotizante fibrinoide y vasculitis necrotizante sistémica, vasculitis ANCA-negativa, y la vasculitis asociada a ANCA, tales como el 20 síndrome de Churg-Strauss (CSS), la granulomatosis de Wegener, y la poliangiítis microscópica), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia Coombs positiva, anemia Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia pura de células rojas o aplasia (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune (s), 25 citopenias tales como pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran la diapédesis de leucocitos, enfermedades inflamatorias del CNS, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de daño múltiple de órganos, los daños secundarios para la septicemia, hemorragia o trauma, enfermedades 30

mediadas por los complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, síndrome de los anticuerpos anti-fosfolípidos, motoneuritis, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide o pénfigo, tal como penfigoide buloso, cicatricial (membrana mucosal), penfigoide, penfigoide de la piel, pénfigo vulgar, pénfigo paraneoplásico, pénfigo foliáceo, pénfigo benigno de la mucosa, y pénfigo eritematoso, epidermólisis bulosa adquirida, inflamación ocular, preferiblemente inflamación ocular alérgica tal como conjuntivitis alérgica, enfermedad bulosa por IgA lineal, inflamación conjuntival inducida autoinmune, poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesiones térmicas debido a una enfermedad autoinmune, pre eclampsia, un trastorno inmunológico complejo, como nefritis compleja inmune, nefritis mediada por anticuerpos, trastornos neuroinflamatorios, polineuropatías, neuropatía crónica, tales como polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (desarrollada en pacientes de infarto del miocardio, por ejemplo), incluyendo la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura post-transfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina, y trombocitopenia autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo, por ejemplo, la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), que incluye la ITP crónica o aguda, escleritis tal como la escleritis cerato idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune del testículo y ovario incluyendo orquitis autoinmune y ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, enfermedad de Grave del ojo (oftalmopatía u oftalmopatía asociada a la tiroides), síndromes poliglandulares, tales como síndromes poliglandulares autoinmunes, por ejemplo, de tipo I (o síndrome de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos, tales como de síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Lambert-Eaton, síndrome de la persona rígida o el hombre rígido, encefalomielitis tal como encefalomielitis alérgica o encefalomielitis alérgica y encefalomielitis alérgica

experimental (EAE), miastenia gravis tal como la miastenia gravis asociada al timoma, degeneración cerebelosa, neuromiotonia, síndrome de opsoclonus o opsoclonus mioclonus (OMS), y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis

5 lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis crónica activa o autoinmunes hepatitis activa crónica, neumonitis, tal como neumonitis intersticial linfoide (LIP), bronquiolitis obliterante (no trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA lineal, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis

10 pustulosa subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis, tal como la cirrosis biliar primaria y pneumonocirrosis, síndrome de la enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, sprue celíaco (enteropatía por gluten), sprue refractario, sprue idiopático, crioglobulinemia tal como crioglobulinemia mixta, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad

15 coronaria arterial, enfermedad autoinmune del oído, tal como enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), pérdida de la audición autoinmune, tal como policondritis refractaria o recurrente, proteinosis alveolar pulmonar, queratitis, tal como el síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado al herpes

20 zóster, amiloidosis, linfocitosis no cancerosas, una linfocitosis primaria, la cual incluye linfocitosis de las células B monoclonales (por ejemplo, la gammopatía monoclonal benigna y gammopatía monoclonal de significación no determinada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tal como epilepsia, migraña, arritmias, alteraciones musculares, sordera, ceguera, parálisis

25 periódica y canalopatías del CNS, autismo, miopatía inflamatoria, focal o segmentaria o glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, fallo endocrino múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, tal como las

30 enfermedades autoinmunes desmielinizantes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por

ejemplo, debido a anticuerpos anti-espermatozoides, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón del criador de aves, angiítis alérgica granulomatosa, angiítis

5 linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción transfusional, lepra, malaria, enfermedades parasitarias, tal como leishmaniasis, kyanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, el síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis

10 pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, mediastinitis fibrosante, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmítis, eritema elevado y persistente, eritroblastosis fetal, faciítis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica), o ciclitis de Fuch, púrpura de

15 Henoch-Schönlein, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS, siglas en inglés), infección por ecovirus, sepsis (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndrome post-vacunación, infección por rubéola congénita, infección por virus

20 Epstein-Barr, parotiditis, síndrome de Evan, fallo gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis post-estreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, ataxia locomotriz progresiva, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis por hipersensibilidad crónica, conjuntivitis, tal como catarro primaveral, queratoconjuntivitis seca, y queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico

25 idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión isquémica por reperfusión y familiar benigna, reperfusión por trasplante de órganos, autoinmunidad retinal, inflamación común, bronquitis crónica obstructiva/enfermedad pulmonar de las vías respiratorias, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos ateroscleróticos (insuficiencia vascular cerebral), tales como encefalopatía arterioesclerótica y

30 retinopatía arterioesclerótica, aspermiogénesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-

Rich, pérdida de la audición sensoneural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática (oftalmitis simpática), oftalmitis neonatal, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, pancreatitis, 5 polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, tinitis, vitiligo linfocelular, síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias, condiciones que involucran la infiltración de células T, deficiencia en la adherencia leucocitaria, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad retardada y aguda mediadas por citocinas y 10 linfocitos T, enfermedades que involucran diapedesis leucocitaria, síndrome del daño múltiple de órganos, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conectivo, 15 síndrome nefrótico, insulinitis, fracaso poliendocrino, síndromes poliglandulares autoinmunes, incluyendo el síndrome poliglandular tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en adultos (AOIH), cardiomiopatía, tal como miocardiopatía dilatada, epidermolisis bulosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no 20 purulenta, sinusitis crónica o aguda, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar, o esfenoidal, sinusitis alérgica, un trastorno relacionado con los eosinófilos tal como la eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen 25 eosinófilos, anafilaxis, espondiloartropatías, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de la telangiectasia atáxica, trastornos autoinmunes asociados con la enfermedades del 30 colágeno, reumatismo tal como artroreumatismo crónico, linfadenitis, respuesta de reducción en la presión arterial, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral, y enfermedades que acompañan a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica,

- glomerulonefritis, daño por reperfusión, trastorno de re-perfusión isquémica, daño por reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia orgánica múltiple, enfermedades bulosas, necrosis cortical renal,
- 5 meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, citotoxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación severa aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis, y endometriosis.
- 10 Como se utiliza en la presente especificación, "la artritis reumatoide" o "RA, siglas en inglés" se refiere a un estado reconocido de la enfermedad que puede ser diagnosticado de acuerdo con el criterio revisado en el año 2000 por la American Rheumatoid Asociacion para la clasificación de la RA, o cualquier criterio análogo, e incluye la RA activa, temprana, e incipiente, como se definen a
- 15 continuación. Los indicadores fisiológicos de la RA incluyen la inflamación de las articulaciones simétricas, la cual es una característica aunque no invariable en la artritis reumatoide. Las inflamaciones fusiformes de las articulaciones interfalángicas proximales (PIP, siglas en inglés), de las manos así como las articulaciones metacarpofalángicas (MCP, siglas en inglés), muñecas, codos,
- 20 rodillas, tobillos, y las articulaciones metatarsiofalángicas (MTP, siglas en inglés), son comúnmente afectadas y la inflamación se detecta fácilmente. El dolor durante el movimiento pasivo es la prueba más sensible para la inflamación de las articulaciones y la inflamación y deformidad estructural a menudo limita el rango de movimiento de la articulación afectada. Cambios típicos visibles incluyen la
- 25 desviación cubital de los dedos en las articulaciones MCP, hiperextensión, o hiperflexión de las articulaciones MCP y PIP, contracturas de flexión de los codos, y la subluxación de los huesos del carpo y de los dedos de los pies. El sujeto con RA puede ser resistente a los DMARDs, ya que los DMARDs no son eficaces o plenamente eficaces en el tratamiento de los síntomas. Los candidatos
- 30 adicionales para la terapia de acuerdo con la presente invención son aquellos que han experimentado una respuesta inadecuada al tratamiento anterior o actual, con inhibidores de TNF, tales como etanercept, infliximab, y/o adalimumab, debido a

la toxicidad o la falta de eficacia (por ejemplo, etanercept durante 3 meses a 25 mg dos veces a la semana o al menos 4 infusiones de infliximab a 3 mg/kg).

Un paciente con "artritis reumatoide activa", significa un paciente con síntomas activos y no latentes de RA. Los sujetos con "artritis reumatoide activa temprana" son los sujetos con diagnóstico de RA activa durante al menos ocho semanas, pero no más de cuatro años, de acuerdo con los criterios de ACR revisados en 1987 para la clasificación de la RA. Los sujetos con "artritis reumatoide temprana" son los sujetos diagnosticados con RA durante por lo menos ocho semanas, pero no más de cuatro años, de acuerdo con los criterios de ACR revisados en 1987 para la clasificación de la RA. La RA temprana incluye, por ejemplo, la aparición de RA en jóvenes, la artritis idiopática juvenil (JIA, siglas en inglés), o RA juvenil (JRA, siglas en inglés).

Los pacientes con "AR incipiente" tienen poli-artritis temprana que no satisfacen plenamente los criterios de ACR para el diagnóstico de la RA, pero se asocia con la presencia de biomarcadores de pronóstico específicos para la RA, tal como anti-CCP y el epítipo compartido. Entre ellas se incluyen los pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos que se presentan con poli-artritis, pero aún no tienen un diagnóstico de RA, y se encuentran en alto riesgo de pasar a desarrollar RA según el criterio de *buena fe* del American College of Rheumatology, ACR, siglas en inglés (95% probabilidad).

"Daño de la articulación" se utiliza en el sentido más amplio y se refiere al daño o destrucción parcial o completa de cualquier parte de una o más articulaciones, incluida la del tejido conectivo y cartílago, donde el daño incluye el daño estructural y/o funcional de cualquier causa, y pueden o no pueden causar dolor en las articulaciones/artralgia. Se incluyen, sin limitación, el daño articular asociado con, o resultante de la enfermedad inflamatoria común así como enfermedades no inflamatorias de las articulaciones. Este daño puede ser causado por cualquier condición, tal como una enfermedad autoinmune, especialmente la artritis, y muy especialmente la RA. Ejemplos de esas condiciones incluyen la artritis aguda y crónica, RA que incluye la RA de aparición juvenil, artritis idiopática juvenil (JIA), o RA juvenil (JRA), y los estados, tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis aguda inmunológica,

artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por el colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, enfermedad de Still, artritis vertebral, artrosis, artritis progrediente crónica, artritis deformante, poli-artritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por agotamiento de los estrógenos y espondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), las enfermedades reumáticas autoinmunes distintas de RA, y la participación sistémica significativa secundaria a la RA (incluyendo pero no limitada a vasculitis, fibrosis pulmonar o el síndrome de Felty). A los efectos de presente especificación, las articulaciones son los puntos de contacto entre los elementos de un esqueleto (de un vertebrado, como un animal), con las partes que lo rodean y lo soportan que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, las caderas, las articulaciones entre las vértebras de la columna vertebral, las articulaciones entre la columna y la pelvis (articulaciones sacro-ilíacas), las articulaciones donde los tendones y ligamentos se unen a los huesos, las articulaciones entre las costillas y la columna vertebral, hombros, rodillas, pies, codos, manos, dedos, tobillos y dedos de los pies, pero sobre todo las articulaciones de las manos y los pies.

Como se utiliza en la presente especificación, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o las células que están siendo tratados, y puede realizarse tanto para la profilaxis o en el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejoría o paliación de la enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. Un sujeto es correctamente "tratado" por ejemplo, para un trastorno autoinmune si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo para la invención de acuerdo con los métodos de la presente invención, el sujeto muestra una reducción y/o ausencia observable de uno o más signos y síntomas de la enfermedad.

En una realización preferida de éxito en el tratamiento, los anticuerpos inducen una importante respuesta clínica en un sujeto con RA. Para los efectos de presente especificación, una "respuesta clínica importante" se define como el logro de una respuesta 70 de la American College of Rheumatology (ACR 70) durante seis meses consecutivos. Las puntuaciones de la respuesta ACR se clasifican como ACR 20, ACR 50 y ACR 70, con la ACR 70 siendo el de más alto nivel de señal y control de los síntomas en este sistema de evaluación. Las puntuaciones de respuesta ACR mide la mejora de la actividad de la enfermedad de la RA, incluida la inflamación y sensibilidad de las articulaciones, dolor, nivel de discapacidad y, en general, la evaluación del paciente y del médico. Un ejemplo de un tipo diferente de anticuerpo que induce una respuesta clínica importante, reconocido por la FDA y, tal como se define en la presente especificación es etanercept (ENBREL®).

Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr los resultados terapéuticos o profilácticos deseados.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un medicamento en la presente especificación puede variar en función de factores tales como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del medicamento, por ejemplo, el anticuerpo, para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del fármaco en cuestión, por ejemplo, el anticuerpo, se ve compensados por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr los resultados profilácticos deseados. Típicamente, pero no necesariamente, debido a que una dosis profiláctica se utiliza en los sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

El término "agente citotóxico", tal como se utiliza en la presente especificación se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción o muerte de las células. El término está destinado a que incluya

isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, como las toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de las mismas.

- 5 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como la tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como la benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo
- 10 altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®),
- 15 acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina;
- 20 pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y uramustina; nitrosoureas tales como la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina;
- 25 antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1I y omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina,
- 30 autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y

deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina;

5 antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, teropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina y

10 floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona, antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; un reabastecedor del ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina;

15 demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene,

20 OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurín A, roridín A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb

25 Oncology, Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como

30 cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; difluorometilornitina

(DMFO); retinoides tales como el ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de 5 ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, la abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden 10 promover el crecimiento del cáncer, y están frecuentemente en la forma de un tratamiento sistémico o que afecta a todo el cuerpo. Estos agentes pueden ser hormonas ellos mismos. Los ejemplos incluyen los antiestrógenos y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (que incluye tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno 15 EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®, antiprogesteronas; reguladores hacia abajo de los receptores de estrógenos (ERD); agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, 20 acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, 25 formestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronat DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, el alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o 30 risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión génica en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1, LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un
5 doble inhibidor de molécula pequeña de las tirosina quinasas ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra célula como mediadores intercelulares.
10 Ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, monocinas, interleucinas (ILS), tales como la IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 e IL-15, incluyendo PROLEUKIN® rIL-2, un TNF, tal como TNF- α o el TNF- β , y otros factores polipeptídicos, incluyendo el factor inhibidor de leucocitos (LIF) y ligando kit (KL). Como se utiliza en la presente especificación, el término citocinas
15 incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos a las citocinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y derivados y sales de estos productos farmacéuticamente aceptables. Un "antagonista de citocina" es una molécula que inhibe o antagoniza tales citocinas
20 mediante cualquier mecanismo, como, por ejemplo, anticuerpos para las citocinas, anticuerpos para los receptores de citocinas, e inmunoadhesinas.

Para los efectos de presente especificación "el factor de necrosis tumoral alfa" o "TNF-alfa" o "TNF α " se refiere a una molécula TNF-alfa humana compuesta por la secuencia de aminoácidos como se describe en *Pennica y otros, Nature, 312:721*
25 *(1984)* o *Aggarwal y otros, J. Biol. Chem., 260:2345 (1985)*.

Un "antagonista del TNF" o "inhibidor del TNF" se define en la presente especificación como una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, abroga, o de cualquier manera interfiere con la actividad del TNF α *in vitro*, *in situ*, y/o preferiblemente *in vivo*. Tal agente inhibe, en cierta medida, una función biológica
30 del TNF-alfa, por lo general a través de la unión al TNF-alfa y neutralizando su actividad. Un buen antagonista del TNF también puede disminuir, bloquear,

abrogar, interferir, impedir y/o inhibir el ARN, el ADN, o la síntesis de proteínas del TNF, la liberación del TNF α , la señalización del receptor de TNF α , la escisión de del TNF α de la membrana, la actividad del TNF α y la producción y/o síntesis del TNF α . Tales antagonistas del TNF, incluyen pero no se limitan a, los anticuerpos anti-TNF α , fragmentos de unión al antígeno del mismo, mutantes especificados o dominios de los mismos que se unen específicamente al TNF α que, al unirse con TNF α , depletan o destruyen las células que expresan el TNF α en un mamífero y/o interfieren con una o más funciones de esas células, un receptor de TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión del mismo, un antagonista del TNF de molécula pequeña, por ejemplo, la proteína de unión I o II del TNF (TBP-I o TBP-II), nerelimonmab, CDP-571, infliximab (REMICADE®), etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA™), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, y similares), fragmentos de unión al antígeno, y moléculas receptoras que se unen específicamente al TNF α , compuestos que previenen y/o inhiben la síntesis de TNF α , la liberación de TNF α , o su acción en las células diana, como la talidomida, tenidap, inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, la pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de adenosina A2b, potenciadores del receptor de adenosina A2b, los compuestos que previenen y/o inhiben la señalización del receptor de TNF α , los inhibidores de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP), los compuestos que bloquean y/o inhiben la escisión del TNF α de la membrana, tales como los inhibidores de metaloproteinasas, compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad de TNF α , tal como la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (por ejemplo, captopril), y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o la síntesis de TNF α , tales como inhibidores de cinasa MAP. El antagonista preferido comprende un anticuerpo o una inmunoadhesina. Ejemplos de antagonistas del TNF que se contemplan específicamente en la presente especificación son etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®) y adalimumab (HUMIRA™).

El término "hormonas" se refiere a las hormonas polipeptídicas, que generalmente son secretadas por los órganos con conductos glandulares. Incluidas entre las hormonas, están por ejemplo, hormona de crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionil, y la hormona de crecimiento bovina, la hormona paratiroidea; la tiroxina, la insulina, la

proinsulina; la relaxina; el estradiol; la terapia de reemplazo hormonal, los andrógenos, tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, la mepitioestana, o la testolactona; la prorelaxina; hormonas glicoproteicas tal como la hormona estimulante de los folículos (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH), la prolactina, el lactógeno de placenta, el péptido asociado a la gonadotrofina de ratón, la hormona liberadora de gonadotrofina; la inhibina; la activina; sustancia inhibidora de mülleriana, y la trombopoyetina. Como se utiliza en la presente especificación, el término hormona incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia nativa, incluidas las entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "factor de crecimiento" se refiere a las proteínas que promueven el crecimiento, e incluyen, por ejemplo, el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico, el factor de crecimiento endotelial vascular, los factores de crecimiento nervioso, tales como el NGF- β ; el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento transformadores (TGFs), tales como el TGF- α y TGF- β , el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; interferones tales como el interferón- α , - β , y γ -, y factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como los CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), y CSF de granulocitos (G-CSF). Como se utiliza en la presente especificación, el término factor de crecimiento incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos del factor de crecimiento de secuencia nativa, incluidas las entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "integrina" se refiere a una proteína receptora que permite que las células se unan y respondan a la matriz extracelular y está involucrada en una variedad de funciones celulares tales como la cicatrización de heridas, diferenciación celular, células tumorales con capacidad de colonizar, y apoptosis.

Son parte de una gran familia de receptores de adhesión celular que están involucrados en las interacciones matriz extracelular-célula y célula-célula. Las integrinas funcionales consisten en dos subunidades de glicoproteínas de transmembrana, llamadas alfa y beta, que son enlazadas no covalentemente. Las subunidades alfa todas comparten alguna homología entre sí, al igual que las subunidades beta. Los receptores siempre contienen una cadena alfa y una cadena beta. Los ejemplos incluyen Alfa6beta1, Alfa3beta1, Alfa7beta1, LFA-1, etc. Como se utiliza en la presente especificación, el término "integrina" incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la integrina de secuencia nativa, incluidas las entidades de molécula pequeña producidas sintéticamente y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un "antagonista de la integrina" es una molécula que inhibe o antagoniza tales integrinas mediante cualquier mecanismo, como, por ejemplo, anticuerpos para la integrina. Ejemplos de "antagonistas o anticuerpos para la integrina" en la presente especificación incluyen un anticuerpo LFA-1, tal como efalizumab (RAPTIVA®) disponibles comercialmente a partir de Genentech, o otros anticuerpos CD11/11a y CD18, o un anticuerpo para la integrina alfa 4, tal como natalizumab (ANTEGREN®) disponible a partir de Biogen, o derivados de fenilalanina diazacíclica (WO 2003/89410), derivados de fenilalanina (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 y WO 2003/53926), derivados del ácido fenilpropiónico (WO 2003/10135), derivados de enamina (WO 2001/79173), derivados del ácido propanoico (WO 2000/37444), derivados del ácido alcanoico (WO 2000/32575), derivados de fenilo sustituido (US 6,677,339 y 6,348,463), derivados de aminas aromáticas (US 6,369,229), ADAM polipéptidos de dominio de la desintegrina (US 2002/0042368), anticuerpos para la integrina alfavbeta3 (EP 633945), derivados de aminoácidos aza-bicíclicos puenteados (WO 2002/02556), etc.

Los "corticosteroides" se refieren a cualquiera de una de varias sustancias sintéticas o de origen natural con la estructura química de los esteroides que imitan o aumentan los efectos de los corticosteroides naturales. Ejemplos de los corticosteroides sintéticos incluyen prednisona, prednisolona (incluyendo

metilprednisolona, tal como SOLU-MEDROL® succinato sódico de metilprednisolona), dexametasona o triamcinolona, dexametasona, hidrocortisona, y betametasona. Los corticosteroides preferidos en la presente especificación son prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona, dexametasona.

- 5 El término "agente inmunosupresor", tal como se utiliza en la presente especificación para la terapia adyuvante, se refiere a las sustancias que actúan para eliminar o enmascarar el sistema inmune de los mamíferos tratados según la presente especificación. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citocinas, regulan hacia abajo o reprimen la expresión de autoantígenos, o
- 10 enmascaran los antígenos del MHC. Ejemplos de tales agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (véase US 4,665,077), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides, tales como cortisol o aldosterona, agentes anti-inflamatorios, tales como un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de los leucotrienos,
- 15 antagonistas de purinas tales como, azatioprina o mofetil micofenolato (MMF); trocado (Ro 32-355), un antagonista del receptor de sigma periférico tal como ISR-31747; agentes alquilantes como la ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, tal como se describe en US 4,120,649); anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos del MHC y
- 20 fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides, tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo SOLU-MEDROL® succinato sódico de metilprednisolona, rimexolona, y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa, tal como el metotrexato (por vía oral o subcutánea), agentes anti-
- 25 malaria, como la clorocina y la hidroxiclорocina, sulfasalazina, leflunomida, inhibidores de liberación de citocinas tales como anticuerpos monoclonales SB-210396 y SB-217969 y un antagonista del MHC II tal como ZD2315, un antagonista de los receptores de PGL tal como ZD4953, un bloqueador de la adhesión a VLA4 tal como ZD7349; anticuerpos anti-citocina o anti receptor de la
- 30 citocina incluyendo anticuerpos anti-interferón-alfa, -beta, o -gamma, anticuerpos anti-TNF-alfa, (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, bloqueadores de la interleucina-1(IL-1) tales como inhibidor de HuLL-1RA e IL-1B recombinantes, anticuerpos anti-

interleucina-2(IL-2) y anticuerpos anti-receptor de IL-2, la toxina de fusión IL-2, anticuerpos anti-L3T4; leflunomida; globulina anti-linfocitos heteróloga; OPC 14597; NISV (modificador de la respuesta inmune), un ácido graso esencial, tal como ácido gammalinolénico o el ácido eicosapentaenoico; bloqueadores CD-4 y

5 anticuerpos pan-T, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; modificador co-estimulador (por ejemplo, fusión de CTLA4-Fc, también conocido como ABATACEPT™), anticuerpos y antagonistas anti-receptor de interleucina-6(IL-6), anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; un péptido soluble que contiene el dominio de unión a LFA-3 (WO 1990/08187),

10 estreptocinasa, IL-10; el factor de crecimiento transformador beta (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN del hospedero; FK506 RS-61443; enlimomab; CDP-855, inhibidor de PNP; CH-3298; GW353430; 4162W94, clorambucilo; deoxiespergualina; rapamicina; receptores de las células T (*Cohen y otros*, US 5, 1 14721), fragmentos de receptores de las células T (*Offner y otros*, *Science*, 251:

15 430-432 (1991); WO 1990/11294; Janeway, *Nature*, 341:482-483 (1989), y WO 91/01133); antagonistas de BAFF tales como anticuerpos BAFF y anticuerpos BR3; antagonistas de zTNF4 (*Mackay y Mackay*, *Trends Immunol*, 23: 113-5 (2002)); agentes biológicos que interfieren con las señales de las células T auxiliares, tales como anti-ligando CD40 o anti-receptor de CD40 (CD154),

20 incluyendo anticuerpos bloqueadores para el ligando CD40-CD40 (por ejemplo, *Durie y otros*, *Science*, 261: 1328-30 (1993); *Mohan y otros*, *J. Immunol*, 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (*Finck y otros*, *Science*, 265: 1225-7 (1994)), y anticuerpos para el receptor de las células T (EP 340109), tal como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferidos en la presente especificación

25 incluyen ciclofosfamida, clorambucilo; azatioprina, leflunomida, MMF, o metotrexato.

Ejemplos de "fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad" o "DMARDs" incluyen clorocina, hidroxiclorocina, miocrisina, auranofina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (más metotrexato

30 oral y subcutáneo), azatioprina, D-penicilamina, sales de oro (orales), sales de oro (intramusculares), minociclina, ciclosporina incluyendo ciclosporina A y ciclosporina tópica, proteína A de estafilococo (*Goodyear y Silverman*, *J. Exp.*

Med., 197, (9), pi 125-39 (2003)), incluidas las sales y derivados de los mismos, etc.

Ejemplos de "fármacos antiinflamatorios no esteroideos" o "AINEs" incluyen la aspirina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y ibuprofeno de liberación retardada, fenoprofeno, piroxicam, flurbiprofeno, naproxeno, ketoprofeno, naproxeno, tenoxicam, benorilato, diclofenac, naproxeno, nabumetona, indometacina, ketoprofeno, ácido mefenámico, diclofenac, fenbufeno, azapropazona, acetmetacina, ácido tiaprofénico, indometacina, sulindac, tolmetin, fenilbutazona, diclofenac y diclofenac de liberación retardada, inhibidores de ciclooxigenasa (COX)-2, tales como GR 253035, MK966, celecoxib (CELEBREX®), 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il), bencenosulfonamida y valdecoxib (BEXTRA®) y meloxicam (MOBIC®), incluidas las sales y derivados de los mismos, etc. Preferentemente, son aspirina, naproxeno, ibuprofeno, indometacina, o tolmetin. Tales AINEs son utilizados opcionalmente con un analgésico, tal como codeína, tramadol, y/o dihidrocodeína o estupefacientes como la morfina.

Una "célula B" es un linfocito que madura en la médula ósea, e incluye una célula B virgen (naïve), célula B de memoria, o célula B efectora (células plasmáticas). Las células B en la presente especificación pueden ser células B normales o no malignas.

El antígeno "CD20", o "CD20", es una fosfoproteína no-glicosilada de cerca de 35-kDa, que se encuentran en la superficie de más del 90% de las células B de la sangre periférica o los órganos linfoides. CD20 está presente en las células B tanto normales como malignas, pero no se expresa en las células madre. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 se describe el Clark y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci (US)* 82: 1766 (1985), por ejemplo. El CD20 preferido es el CD20 de primates no humanos, o humanos, más preferiblemente CD20 humano.

El antígeno "CD22", o "CD22", también conocido como BL-CAM o Lyb8, es una glicoproteína de membrana integral de tipo 1 con peso molecular de aproximadamente 130 (reducido) a 140kD (no reducido). Se expresa tanto en el citoplasma y en la membrana celular de los linfocitos B. El Antígeno CD22

aparece tempranamente en la diferenciación de linfocitos de las células B en aproximadamente la misma etapa que el antígeno CD19. A diferencia de otros marcadores de las células B, la expresión en membrana de CD22 se limita a los estadios de diferenciación finales comprendidos entre las células B maduras (CD22+) y las células plasmáticas (CD22-). El antígeno CD22 se describe, por ejemplo, en Wilson y otros, *J. Exp. Med.* 173: 137 (1991) y Wilson y otros, *J. Immunol.* 150:5013 (1993).

Un "antagonista para un marcador de superficie de las células B" es una molécula que, tras la unión a un marcador de superficie de las células B, depleta o destruye las células B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de las células B, por ejemplo, mediante la reducción o prevención de una respuesta humoral suscitado por la célula B. El antagonista preferiblemente es capaz de agotar las células B (es decir, reducir los niveles de las células B circulantes) en un mamífero tratado con él. Esa disminución puede lograrse a través de diversos mecanismos, tales como ADCC y/o CDC, la inhibición de la proliferación de las células B y/o la inducción de la muerte de las células B (por ejemplo, a través de la apoptosis). Los antagonistas incluidos en el ámbito de la presente invención incluyen anticuerpos, péptidos sintéticos o de secuencia nativa, inmunoadhesinas, y antagonistas de moléculas pequeñas que se unen a un marcador de superficie de las células B, opcionalmente conjugado con o fusionado a otra molécula. El antagonista preferido comprende un anticuerpo o inmunoadhesina. Incluye antagonistas de BLyS tal como inmunoadhesinas, y es preferiblemente lumiliximab anticuerpo (anti-CD23), CD20, CD22, o BR3 o inmunoadhesina BLyS. La inmunoadhesina BLyS preferentemente se selecciona del grupo compuesto por inmunoadhesina BR3 que incluye el dominio extracelular de BR3, la inmunoadhesina TACI incluye el dominio extracelular de TACI, y la inmunoadhesina BCMA incluye el dominio extracelular de BCMA. La inmunoadhesina BR3 mayormente preferida es hBR3-Fc de ID SEC NO: 2 de WO 2005/00351 US y 2005/0095243. Véase también 2005/0163775 US y WO 2006/068867. Otro antagonista BLyS preferido es un anticuerpo anti-BLyS, más preferiblemente donde el anticuerpo anti-BLyS se une a BLyS dentro de una región de BLyS que comprende los residuos de 162-275, o un anticuerpo anti-

BR3, más preferiblemente donde el anticuerpo anti-BR3 se une a BR3 en una región que comprende los residuos 23-38 de BR3 humanos.

Ejemplos de anticuerpos CD20 incluyen: "C2B8", que ahora se denomina "rituximab" ("RITUXAN®") (US 5,736,137) y fragmentos de éstos que retienen la
5 habilidad de unirse a CD20, el anticuerpo murino marcado con titrio-[90] denominado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (Zevalin®) disponibles comercialmente a partir de IDEC Pharmaceuticals, Inc. (US 5,736,137; 2B8 depositado en la ATCC bajo el número de acceso HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a murina "B1", también llamado "Tositumomab", opcionalmente
10 marcado con I¹³¹, para generar el "I¹³¹-B1" o el "anticuerpo tositumomab yodado I¹³¹" (BEXXAR™) disponible comercialmente a partir de Corixa (véase, también, US 5,595,21); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press y otros, *Blood* 69(2):584-591 (1987) y variantes del mismo que incluyen el "marco parcheado" o humanizado 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC depósito HB-96450);
15 anticuerpo quimérico 2H7 y murino 2H7 (US 5,677,180); un humanizado 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman y otros.) como se enuncian a continuación); el anticuerpo completamente humano de alta afinidad HUMAX-CD20™ dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de las células B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y Van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510
20 (2003) y Cragg y otros, *Blood* 101: 1045-1052 (2003)); los anticuerpos monoclonales humanos enunciados en WO 2004/035607 (Teeling y otros); los anticuerpos AME-133™ (Applied Molecular Evolution); GA1O1 (GlycArt; US 2005/0123546); anticuerpo A20 o sus variantes tales como anticuerpos quiméricos o humanizados de A20 (A20c, A20h, respectivamente) (US
25 2003/0219433, Immunomedics) y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2, disponibles a partir de International Leukocyte Typing Workshop (Valentina y otros, en: *Leukocyte Typing III* (McMichael, ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). Los anticuerpos CD20 preferidos en la presente especificación son quiméricos, humanizados, o anticuerpos CD20 humanos, más
30 preferiblemente rituximab, un 2H7 humanizado, anticuerpos A20 quiméricos o humanizados (Immunomedics), y el anticuerpo humano para CD20 HUMAX-CD20™ (Genmab).

Exclusivamente para los fines de la presente especificación, y a menos que se indique lo contrario, un "2H7 humanizado" se refiere a un anticuerpo para CD20 humanizado, un fragmento del mismo que se une a un antígeno, donde el anticuerpo es efectiva en agotar las células B de primates in vivo. El anticuerpo incluye aquellos enunciados en US 2006/0062787 y en las figuras del mismo, e incluyendo dichos anticuerpos las secuencias que se proporcionan en US 2006/0188495. Véase también US 2006/0024300 y 2006/0034835. En un resumen de las diversas realizaciones preferidas de la invención, la región V de variantes basadas en la versión 16 de 2H7 divulgada en US 2006/0062787 tendrán la secuencias de aminoácidos de v16 excepto en las posiciones de las sustituciones de aminoácidos que se indican en la tabla de abajo. Salvo se indique lo contrario, las variantes de 2H7 tendrán la misma cadena L que v16.

Version 2H7	Cambios en la cadena pesada (V _H)	Cambios en la cadena ligera(V _L)	Cambios en Fc
16			
A			S298A, E333A, K334A
B	N100A	M32L	
C	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
D	D56A, N100A	S92A	
E	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
F	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
G	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K332A
H	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
I	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
J			K334L

El 2H7 humanizado preferido es un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de la versión 16, o de cualquiera de las versiones que figuran más arriba.

Los "antagonistas BAFF" en la presente especificación son las moléculas que bloquean la actividad de BAFF o BR3. Entre ellas se incluyen inmunoadhesinas que incluyen una porción de BR3, TACI, o BCMA que se une BAFF, o variantes del mismo que se unen a BAFF. En otras realizaciones, el antagonista BAFF es

un anticuerpo BAFF. Un "anticuerpo BAFF" es un anticuerpo que se une a BAFF, y preferiblemente se une a BAFF dentro de una región del BAFF humano que comprende los residuos 162-275 de un BAFF humano. En otra realización, el antagonista BAFF es anticuerpo BR3. Un "anticuerpo BR3" es un anticuerpo que
5 se une a BR3, y es preferiblemente uno que se une a BR3 dentro de una región de BR3 humano que comprende los residuos 23-38 de BR3 humanos. Las secuencias de BAFF humano y BR3 humanos se encuentran, por ejemplo, en US 2006/0062787. Otros ejemplos de polipéptidos de unión a BAFF o anticuerpos BAFF se pueden encontrar en, por ejemplo, WO 2002/092620, WO 2003/014294,
10 Gordon y otros, *Biochemistry* 42(20): 5977-5983 (2003), Kelley y otros, *J. Biol. Chem.*, 279 (16): 16727-16735 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 y WO 2000/40716.

La administración "crónica" se refiere a la administración de medicamento(s) en un modo continuo en lugar de un modo agudo, con el fin de mantener el efecto
15 terapéutico inicial (actividad) para un período de tiempo prolongado. La administración "Intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que más bien es de carácter cíclico.

Los "Portadores", tal como se utilizan en la presente especificación son portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son
20 no tóxicos a las células de los mamíferos expuestos a ellos en las dosis y las concentraciones empleadas. A menudo, el portador es una solución tamponada acuosa de pH negativo fisiológicamente aceptable. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen búferes como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso
25 molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, lisina o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, como EDTA, alcoholes de azúcar como el
30 manitol o sorbitol, contraiones formadores de sal tal como el sodio, y/o surfactantes no iónicos, tales como Tween™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

El término "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los seres humanos, los animales de granja y domésticos, de zoológico, de deporte, o animales de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, *etc.* Preferentemente, el mamífero en la presente especificación es humano.

- 5 Un "prospecto" se refiere habitualmente a las instrucciones incluidas en los paquetes comerciales de medicamentos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos que se podrán combinar con el producto envasado, y/o advertencias relativas a la utilización de dichos medicamentos, *etc.*
- 10 Un "kit" es cualquier manufactura (por ejemplo, un paquete o contenedor) que incluya al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune como el RA, lupus, esclerosis múltiple, o IBD. La manufactura es preferiblemente promovida, distribuida o vendida como una unidad para la realización de los métodos de la presente invención.
- 15 Un "público objetivo" es un grupo de personas o una institución a quien o para quien un medicamento está siendo promovido o destinado a ser promovido, mediante la comercialización o publicidad, especialmente para usos particulares, tratamientos o indicaciones, tales como pacientes, poblaciones de pacientes, lectores de periódicos, literatura médica, y revistas, espectadores de televisión o
- 20 Internet, oyentes de radio o Internet, médicos, las compañías farmacéuticas, *etc.*

Un "medicamento" es un fármaco activo para el tratamiento de la enfermedad en cuestión o de sus síntomas o efectos secundarios.

- El término "aproximadamente", tal como se utiliza en la presente especificación se refiere a la gama habitual de error para el valor respectivo fácilmente conocido
- 25 para la persona cualificada en este ámbito técnico.

Modos de llevar a cabo la invención.

En una realización, la invención contempla un anticuerpo LT α aislado que incluye al menos una secuencia CDR, seleccione del grupo consistente en:

- (a) una secuencia CDR-L1 que comprende los aminoácidos de A1-A11, donde
- 30 A1-A11 es KASQAVSSAVA (ID SEC NO: 1) o RASQAVSSAVA (ID SEC NO: 2), o compuesto por aminoácidos A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYSTNQKNFLA

- (ID SEC NO: 3) o KSSQSLLYSANQKNFLA (ID SEC NO: 4) o KSSQSLLYSTNQKNALA (ID SEC NO: 6), donde N es cualquier aminoácido (2C8 quiméricos o 2C8.v2/2C8.vX humanizados o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado / 3F12.v14 humanizado, o clon 3F12 14 o 17, respectivamente);
- 5 (b) una secuencia CDR-L2 que comprende aminoácidos B1-B7, donde B1-B7 es SASHRYT (ID SEC NO: 7) o WASTRDS (ID SEC NO: 8) (2C8 quimérico /2C8.v2 humanizado /2C8.vX humanizado o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado /3F12.v14 humanizado, respectivamente);
- (c) una secuencia CDR-L3 que comprende los aminoácidos C9-C1, donde C1-C9
10 es QQHYSTPWT (ID SEC NO: 9) o QENYSTPWT (ID SEC NO: 11) o QQYYSYPRT (ID SEC NO: 13) o QQYASYPRT (ID SEC NO: 14) o QQYYAYPRT (ID SEC NO: 15), donde N es cualquier aminoácido (2C8 quimérico /2C8.v2 humanizado o un clon de 2C8 G7 o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado /3F12.v14 humanizado o clon de 3F12 20 o clon de 3F12 21, respectivamente);
- 15 (d) una secuencia CDR-H1 que comprende los aminoácidos D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYVIH (ID SEC NO: 16) o GYTFSSYWIE (ID SEC NO: 17) (2C8 quimérico /2C8.v2 humanizado /2C8.vX humanizado o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado / 3F12.v14 humanizado, respectivamente);
- (e) una secuencia CDR-H2 que comprende los aminoácidos E1-E17, donde E17-
20 E1 es YNNPYNDGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 18) o EISPGSGSTNYNEEFKG (ID SEC NO: 19) o YNNPYNAGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 101) o EINPGSGSTIYNEKFKG (ID SEC NO: 110), donde N es cualquier aminoácido (2C8 quimérico /2C8.v2 humanizado o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado, o 2C8.vX humanizado, o 3F12.v14 humanizado, respectivamente), y
- 25 (f) una secuencia CDR-H3 que comprende los aminoácidos F1-F9, donde F1-F9 es PTMLPWFAY (ID SEC NO: 20), o compuesto por aminoácidos F1-F5, donde F1-F5 es GYHGY (ID SEC NO: 21) o GYHGA (ID SEC NO: 22) (2C8 quimérico /2C8.v2 humanizado /2C8.vX humanizado o 3F12 quimérico /3F12.v5 humanizado /3F12.v14 humanizado o clon de 3F12 12, respectivamente) .
- 30 En una realización preferida, ID SEC NO: 3 es KSSQSLLYSTAQKNFLA (ID SEC NO: 5) (clon de 3F12 15). En una realización adicional preferida, ID SEC NO: 11

es QESYSTPWT (ID SEC NO: 10) (clon de 2C8 A8/2C8.vX humanizado) o QEVYSTPWT (ID SEC NO: 12) (clon de 2C8 H6).

En otra realización preferida, la secuencia CDR-L1 es ID SEC NO: 2 o 3 o 4 o 6.

En otro aspecto preferido, el anticuerpo comprende ya sea (i) de la totalidad de las secuencias de aminoácidos de CDR-L1 a CDR-L3 de las ID SEC NOs: 1 o 2 y 7 y 9, o de las ID SEC NOs: 1 o 2 y 7 o 8 y 11, o de las ID SEC NOs: 3, 8, y 13, o de las ID SEC NOs: 4, 5 o 6, 8, y 13, o de las ID SEC NOs: 3, 8, y 14 o 15, o de las ID SEC NOs: 4, 5 o 6, 8, y 14 o 15, o (ii) de la totalidad de las secuencias de aminoácidos CDR-H1 a CDR-H3 ID SEC NOs: 16, 18 y 20, o la totalidad de las ID SEC NOs: 16, 101, y 20, o la totalidad de las ID SEC NOs: 17, 19, y 21 o 22, o la totalidad de las ID SEC NOs: 17, 110, y 21.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende ya sea todas las NOs ID SEC: 1 o 2 y 7 y 9, o la totalidad de las ID SEC NOs: 16, 18 y 20, o la totalidad de las ID SEC NOs: 16, 101, y 20. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende ya sea todos los ID SEC NOs: 3, 8, y 13, o la totalidad de las ID SEC NOs: 17, 19, y 21 o 22. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende ya sea todas las NOs ID SEC: 4, 8, y 14, o la totalidad de las ID SEC NOs: 17, 110, y 21. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende (i) la totalidad de las secuencias de aminoácidos de CDR-L1 a CDR-L3 de las ID SEC NOs: 1 o 2, 7 y 9, o de las ID SEC NOs: 1 o 2 y 7 u 8 y 11, de las ID SEC NOs: 3, 8, y 13, o de las ID SEC NOs: 4, 5 o 6, 8, y 13, o de las ID SEC NOs: 3, 8, y 14 o 15, o de SEQ NOs ID: 4, 5 o 6, 8, y 14 o 15, y (ii) la totalidad de las secuencias de aminoácidos CDR-H1 a CDR-H3 de las ID SEC NOs: 16, 18 y 20, o de las ID SEC NOs: 16, 101, y 20, o de las ID SEC NOs: 17, 19, y 21 o 22, o de las ID SEC NOs: 17, 110, y 21.

Un aspecto preferido es un anticuerpo anti-LT α que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende ID SEC NO: 23 o 24, o un dominio variable de cadena pesada que comprende ID SEC NO: 25 o 26, o que tengan dominio variable cadena pesada y de cadena ligera que incluyen ID SEC NOs: 23 y 25, o ambos ID SEC NOs: 24 y 26.

Más preferido es un anticuerpo anti-LT α con un dominio variable de cadena ligera que comprende ID SEC NO: 27 o 28, o un dominio variable de cadena pesada

que comprende ID SEC NO: 29, 30, o 31, o que tenga los dos dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada que comprende las ID SEC NOs: 27 y 29, o ambos ID SEC NOs: 27 y 30, o ambos ID SEC NOs: 27 y 31, o ambos ID SEC NOs: 28 y 30, o ambos ID SEC NOs : 28 y 31. En un aspecto adicional, la

5 invención proporciona un anticuerpo anti-LT α con un dominio variable de cadena ligera que comprende ID SEC NO: 102, o un dominio variable de cadena pesada que comprende ID SEC NO: 103, o que tenga los dos dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada que comprende ambos ID SEC NOs: 102 y 103. En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-LT α con

10 un dominio variable de cadena ligera que comprende ID SEC NO: 108, o un dominio variable de cadena pesada que comprende ID SEC NO: 109, o que tenga los dos dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada que comprende ambos ID SEC NOs: 108 y 109.

Los anticuerpos en otras realizaciones incluyen una secuencia de marco de consenso del subgrupo 1 K humano, y/o están compuestos por un secuencia de

15 marco de consenso de subgrupo III humano de cadena pesada, donde la secuencia de marco preferiblemente incluye una secuencia de sustitución en la posición 71, 73, y/o 78. Tales sustituciones son preferentemente R71A, N73T, o N78A, o cualquier combinación de éstos, preferiblemente las tres.

20 Los anticuerpos de la presente invención se unen preferentemente a LT α 3 y bloquean la interacción de LT α 3 con TNFR1 y TNFR2. Preferiblemente, también se unen al complejo LT α β y sobre todo en la superficie de la célula. Preferiblemente, también bloquean la función de LT α β , y/o, preferentemente, contienen una región Fc, y/o disminuyen los niveles de citocinas inflamatorias

25 asociadas con RA en un ensayo *in vitro* de artritis inducida por colágeno o un ensayo *in vitro* de artritis inducida por anticuerpos. Un anticuerpo más preferido bloquea la interacción de LT α β con LT β -R y/o modula las células que expresan LT α β . En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-LT α sustancialmente neutraliza al menos una actividad de por lo menos una proteína LT α .

30 Preferiblemente, el anticuerpo de presente especificación se direcciona a cualquier célula que exprese LT α , y preferiblemente agota las células secretoras o LT α -positivas.

Los anticuerpos preferidos en la presente especificación se unen a LT α con una afinidad de al menos 10^{-12} M, más preferiblemente al menos unos 10^{-13} M. Los anticuerpos también son preferentemente de isotipo IgG, como IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o, más preferiblemente IgG humana, y más preferiblemente IgG1 o
5 IgG2a.

Otro anticuerpo preferido tiene una afinidad monovalente a LT α humano que es aproximadamente igual o superior a la afinidad monovalente a LT α humana de un anticuerpo murino producido por una línea celular de hibridoma depositado en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-7538 (hibridoma
10 murino Linfotóxina alfa2 beta1s5H3.2.2).

Como está bien establecido en el arte, la afinidad de unión de un ligando a su receptor puede ser determinada utilizando cualquiera de una variedad de ensayos, y se expresa en términos de una variedad de valores cuantitativos. En consecuencia, en una realización, la afinidad se expresa en valores de Kd y
15 refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos avidez reducidos al mínimo). En general, y preferentemente, la afinidad se mide in vitro, ya sea en una configuración libre de células o asociado a células. La diferencia de veces en la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la proporción de la afinidad monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma Fab) y
20 la afinidad monovalente del valor de un anticuerpos de referencia y de comparación de (por ejemplo, en forma Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias donantes CDR), donde los valores de afinidad se determinan en las mismas condiciones de ensayo.

Así, en una realización, la diferencia de veces en la afinidad de unión se
25 determina como la proporción de los valores de Kd del anticuerpo humanizado en la forma Fab y dicho anticuerpo Fab de referencia/comparación. Por ejemplo, en una realización, en caso de que un anticuerpo para la invención (A) tiene una afinidad que es "tres veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (H), entonces si el valor de Kd es 3x, el valor de Kd de M sería 1x, y la proporción de Kd de A con el Kd de M sería de 3:1. Por el contrario, en una realización, si un
30 anticuerpo para la invención (C) tiene una afinidad que es "tres veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces si el valor de Kd para C

es 1x, el valor de Kd de R sería de 3x, y la proporción del Kd de C. con el Kd de R sería de 1:3. Cualquier ensayo conocido en la materia, incluyendo los descritos en la presente especificación, pueden utilizarse para obtener mediciones de afinidad, incluido, por ejemplo, un biosensor óptico que utiliza SPR (Biacore®), RIA, y
5 ELISA. Preferentemente, la medición es de biosensores ópticos o por radioinmunoensayo.

Los anticuerpos en la presente especificación son preferiblemente quiméricos o humanizados, más preferiblemente humanizados, y aún más preferiblemente anticuerpos que por lo menos una parte de su secuencia de marco es una
10 secuencia de marco de consenso humano.

Otra realización en la presente especificación es un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente a el anticuerpo de presente especificación.

Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden ser realizados utilizando el método de los
15 hibridomas descrito por primera vez por Köhler y otros, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden ser realizados por métodos de ADN recombinante (US 4.816.567). En el método de hibridoma, un ratón u otro tipo de animal hospedero, tal como un hámster, es inmunizado, tal como se describe más arriba para obtener los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen
20 específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se encuentran aislados y luego fusionados con una línea de células de mieloma utilizando un agente de fusión, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*,
25 pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado, dicho medio preferiblemente contiene una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las , los células de mieloma parentales no fusionadas (también refida como parejas de fusión). Por
30 ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo

para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

La pareja de fusión de células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células no fusionadas parentales. Las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponible de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, y SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, US. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromyeloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984), y Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques And Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo donde las células de hibridomas están creciendo es ensayado para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de la unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células del hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como RIA o ELISA.

La afinidad de unión los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, puede ser determinada por el análisis descrito en Scatchard Munson y otros, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Una vez que las células de hibridomas que producen los anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseada se identifican, los clones pueden ser subclonados mediante la limitación de los procedimientos de dilución y crecimiento por métodos estándar (Goding, Monoclonales antibodies: Principles y Practice, pg.59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin son, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por el subclones son debidamente separados del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando un medio de proteína A o proteína-G SEFAROSA) o
5 cromatografía de intercambio de iones, cromatografía hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a
10 los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que luego son transfectados en las células hospederas, tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma
15 que de otro modo no producen proteína de anticuerpos, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospederas. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y otros., *Curr. Opinion in Immunol*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

20 En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty y otros, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y otros, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de los
25 anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones subsecuentes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (nm) mediante aleatorización de cadena (Marks y otros. *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para la construcción de grandes
30 bibliotecas de fagos (Waterhouse y otros, *NUC. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de

hibridomas productores de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de los anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo pueden ser modificados para producir anticuerpos quiméricos o polipéptidos de fusión, por ejemplo, mediante la
5 sustitución de secuencias de dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera (C_H y C_L) para las secuencias murinas homólogas (US 4816567 y Morrison, y otros, Proc. Natl Acad. Sci. US, 81: 6851 (1984)), o por la fusión de la secuencia que codifica la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las
10 secuencias del polipéptido de no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidas por los dominios variables de un sitio de combinación del anticuerpo al antígeno para crear un anticuerpo quimérico bivalente que incluye un sitio de combinación de antígeno que tiene una especificidad para el antígeno y otro sitio de combinación de
15 antígeno que tiene una especificidad para un antígenos diferente.

Anticuerpos humanizados

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. Distintos métodos para la humanización de anticuerpos no humanos son conocidos en el arte. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de
20 aminoácidos que se introducen en el a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que suelen ser tomadas de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y otros (Jones y otros Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y otros Nature
25 332:323-327 (1988); Verhoeven y otros Science 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias CDR correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, los anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (US 4,816,567) donde un dominio variable humano menor que sustancialmente intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de
30 una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR, y

Patente de
Invencción

Organización y
Distribución GSA MDA

OL
R6F

09/48/30

2/2

posiblemente, algunos residuos FR son sustituidos por los residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros y pesados, que se utilizará en hacer los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la
5 antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un roedor es cribado contra la biblioteca completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que esté más cercana a la de los roedores es aceptada como el marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims y otros, J. Immunol.
10 151:2296 (1993); Chothia y otros, Biol. J. MDI. 196:901 (1987). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos de un determinado subgrupo de cadenas pesadas o ligeras. El mismo marco puede ser utilizado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 89:4285 (1992); Presta y otros. J. Immunol, 151:
15 2623 (1993).

Es más importante que los anticuerpos sean humanizados con la retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de secuencias parentales y
20 varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Los programas de ordenador están disponibles e ilustran y muestran las estructuras conformacionales probables tridimensionales de las secuencias de
25 inmoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estos gráficos permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidato de inmunoglobulina, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados de los
30 receptores y las secuencias de importación a fin de que las características de los anticuerpos, como el aumento de afinidad para el antígeno(s), se consigan. En

general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en la influencia de la unión a el antígeno.

El anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como por ejemplo un Fab, que es opcionalmente conjugado con uno o más agentes
5 citotóxicos (s) con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

Anticuerpos humanos y metodología de exposición en fagos.

Como alternativa a la humanización, los anticuerpos humanos pueden ser
10 generados. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, en la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región que une la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes
15 quiméricos y de línea germinal resulta en la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en la línea germinal esos ratones mutantes se traducirán en la producción de anticuerpos humanos ante el desafío de los antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits y otros, Proc. Natl. Acad. Sci.
20 US, 90:2551 (1993); Jakobovits y otros, Nature, 362:255-258 (1993); Brüggemann y otros, Year in Immuno., 7:33 (1993); US 5545806, 5569825, 5591669 (todos GenPharm), y 5545807, y WO 1997/17852.

Como alternativa, la tecnología de exposición en fagos (McCafferty y otros, Nature 348:552-553 (1990)) puede ser utilizada para producir anticuerpos humanos y
25 fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de de los repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpos son clonados en el marco, ya sea en un gen de proteínas de capa mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de
30 anticuerpos funcionales en la superficie de las partículas de fagos. Debido a que la partícula filamentosa contiene una sola copia de la cadena de ADN del genoma de los fagos, las selecciones basadas en las propiedades funcionales de los

- anticuerpos tambien dan como resultado la selecci3n del gen que codifica el anticuerpo que exhibe las propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las c3lulas LT α . La exposici3n en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, examinados en, por ejemplo, Johnson y Chiswell, *Current*
- 5 *Opinion In Structural Biology* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de los segmentos de gen V se pueden utilizar para la exposici3n en fagos. Clackson y otros, *Nature*, 352:624-628 (1991) se aislaron con una diversa gama de anticuerpos anti-oxazolona de una peque1a biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de los ratones inmunizados. Un repertorio de los genes V
- 10 obtenidos a partir de donantes humanos no inmunizados puede ser construido y anticuerpos para una gran variedad de ant3genos (incluyendo autoant3genos) pueden ser aislados fundamentalmente siguiendo las t3cnicas descritas por Marks y otros, *J. MDI. Biol.* 222:581-597 (1991) o Griffith y otros, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). V3ase, tambi3n, US 5,565,332 y 5,573,905.
- 15 Como se ha se1alado anteriormente, los anticuerpos tambi3n pueden ser generados por c3lulas B activadas in vitro (v3ase US 5567610 y 5229275).

Fragmentos de anticuerpos.

En determinadas circunstancias existen ventajas en la utilizaci3n de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tama1o de los

20 fragmentos permite una r3pida limpieza, y puede conducir a un mejor acceso a los tumores s3lidos.

Diversas t3cnicas se han desarrollado para la producci3n de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron a trav3s de la digesti3n proteol3tica de anticuerpos intactos (v3ase, por ejemplo, Morimoto y

25 otros, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan y otros., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos directamente por las c3lulas hospederas recombinantes. los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden ser expresados en y secretada y de *E. coli*, lo que permite la f3cil producci3n de grandes cantidades de

30 estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos mencionadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden ser directamente recuperados

de *E. coli* y químicamente unidos para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y otros. *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente a partir del cultivo de células Hospederas recombinantes. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con un aumento de vida media *in vivo* que incluye un receptor salvaje que se une a residuos de epítipo se describen en la patente US N° 5,869,046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para un experto en el arte. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de cadena simple Fv (scFv). Véase, por ejemplo, WO 1993/16185; US 5571894, y US 5587458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes, por lo tanto, son aptos para la reducción de la unión inespecífica durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión sFv pueden ser construidas para producir una fusión de una proteína efectora, ya sea en el amino o carboxilo terminal de la de un sFv. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpos lineal", por ejemplo, como se describe en US 5641870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o bispecíficos.

Anticuerpos biespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos diferentes epítopos de la proteína $LT\alpha$. Otros anticuerpos como este puede combinar un sitio de unión $LT\alpha$ con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti- $LT\alpha$ puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3), o para los receptores Fc de la IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), o NKG2D o otro ligando activante de células NK, con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celular hacia las células que expresan $LT\alpha$. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan $LT\alpha$. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a $LT\alpha$ y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporin, anti-interferón α , alcaloide de vinca, cadena de ricina A, metotrexato o isótopo

hapteno radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparadas como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

WO 1996/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII y US 5837234 revela un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RI. Un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fc α se muestra en WO 1998/02463. US 5821337 muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos de longitud completa biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes características (Millstein y otros, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que es generalmente realizada por pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y el resultado en productos es bajo. Procedimientos similares se divulgan en WO 1993/08829, y, en Traunecker y otros, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios combinantes de antígeno-anticuerpo) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada Ig, que incluya al menos una porción de la bisagra, regiones C_H2 y C_H3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y son co-transfectados en una célula hospedera adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones donde la desigualdad de las proporciones de las tres cadenas del polipéptido utilizadas en la construcción

ofrecer el rendimiento óptimo de los anticuerpos biespecíficos deseados. Sin embargo, es posible insertar el código de secuencias de las dos o las tres cadenas del polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en igualdad de proporciones resulta en altos
5 rendimientos, o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de la cadena deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadenas ligeras y pesadas de
10 inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se constató que esta estructura asimétrica facilita la separación de los compuestos biespecíficos de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, debido a que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica establece una
15 manera fácil de separación. Este enfoque se presenta en WO 1994/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh y otros, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

En otro enfoque (US 5731168), la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos pueden ser diseñada para maximizar el porcentaje de heterodímeros
20 que se recuperan a partir del cultivo celular recombinante. La mejor interfaz se compone por lo menos de una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se sustituirán con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina y triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntica
25 al de la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpos mediante la sustitución de las cadenas laterales grandes de aminoácidos con cadenas laterales más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción de heterodímero por encima de los productos finales no deseados tales como los
30 homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado

puede ser acoplada a avidina, y el otro a la biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para dirigir las células del sistema inmunitario a las células no deseadas (US 4676980), y para el tratamiento de la infección por el VIH (WO 1991/00360, WO 1992/20373, y el PE 03089). Los anticuerpos
5 heteroconjugados pueden hacerse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los métodos de reticulación adecuados son bien conocidos en el arte, y se revelan, por ejemplo, en US 4676980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

Técnicas para la generación de anticuerpos a partir de fragmentos de anticuerpos
10 biespecíficos también han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados por vinculación química. Brennan y otros, Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento donde los anticuerpos intactos son proteolíticamente escindidos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente acomplejante ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditioles vecinales e impedir la formación de
15 disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convertirán, entonces, a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierten en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de los demás derivados de Fab' -TNB para formar el
20 anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes selectivos para la inmovilización de enzimas.

Recientes avances han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH a partir de *E. coli*, que puede ser químicamente unida para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y otros, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describe la
25 producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado a partir de *E. coli* y sometido a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado se puede vincular a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así
30 como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra los objetivos de tumor de mama.

- Diversas técnicas para aislar y hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes también se han descrito. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido elaborados mediante cremalleras de leucina. Kostelny y otros, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992).
- 5 Los péptidos de las cremalleras de leucina provenientes de las proteínas Fos y Jun fueron enlazados a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y volver a oxidarse para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la
 - 10 producción de anticuerpos homodímeros. La tecnología "diabody" descrita por Holliger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecífico. Los fragmentos incluyen un V_H conectado a un V_L por un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena.
 - 15 En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a parearse con los dominios complementarios V_H y V_L de otro fragmento, para formar dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de una sola cadena Fv (sFv) también ha sido reportada. Véase Gruber y otros, *J. Immunol*, 152:5368 (1994).
 - 20 Anticuerpos con más de dos valencias se contemplan. Por ejemplo, anticuerpos triespecíficos pueden ser preparados. Tutt y otros, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes.

- Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que el
- 25 anticuerpo que se une. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígenos (por ejemplo, anticuerpos tetravalente), que pueden ser fácilmente producidos por la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica la cadena polipeptídica del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede
 - 30 incluir un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo se compondrá de una región Fc y

tres o más sitios de unión a antígenos amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente especificación se compone de (o consiste en) de tres a ocho, pero preferentemente cuatro, de sitios de unión a antígeno. Los anticuerpos multivalentes incluyen, al menos, una cadena polipéptidica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la(s) cadena(s) polipéptidica(s) incluyen dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena polipeptídica podrá incluir VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, FC es una cadena polipéptidica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) podrán consistir en: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc, o VH-VH-CH1-CH1-cadena de región Fc. Los anticuerpos multivalentes preferidos en la presente especificación incluyen además al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los anticuerpos multivalentes de presente especificación pueden, por ejemplo, incluir alrededor de dos a ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en la presente especificación incluyen un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además incluyen un dominio CL.

20 Vectores, Células Hospederas, y Métodos Recombinantes

Selección y transformación de células hospederas

Las células hospederas adecuadas para la clonación o que expresan anticuerpos monoclonales recombinantes, inmunoadhesinas, y otros antagonistas del polipéptido descritos en la presente especificación son procariotas, levadura, o células eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacteria, tal como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, la *Salmonella* *tifimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41p divulgada en DD 266710 publicada 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedero de clonación de *E. coli* preferido es la

E. coli 29A (ATCC 31446), aunque otras cepas como la *E. coli* B, X1776 *E. coli* (ATCC 31537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no restrictivos.

Los anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en las bacterias, en particular cuando la glicosilación y las funciones efectoras de Fc no son necesarios, tal como cuando el anticuerpo terapéutico es conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo demuestra la eficacia de la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de anticuerpos y fragmentos de polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, US 5648237, 5789199 y 5840523, que describe la región de iniciación-traducción (TIR) y una secuencia de señales para la optimización de la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo está aislado de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede ser purificado mediante, por ejemplo, una columna de proteína G o A en función del isotipo. La purificación final puede ser llevada a cabo de forma similar al proceso de purificación de anticuerpos expresado por ejemplo, en células CHO. Para la producción de anticuerpos monoclonales en general, véase también US 7011974.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospederos de clonación o de expresión adecuados para los anticuerpos de codificación, tales como vectores de codificación de anticuerpos LT α . *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos hospederos eucarióticos menores. Sin embargo, una serie de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente especificación, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospederos *Kluyveromyces*, tal como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, y *AT. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*, y hongos filamentosos, por

ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospederos de *Aspergillus* como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospederas adecuadas para la expresión, por ejemplo, del anticuerpo que se une a LT α glicosilado son las derivadas de organismos multicelulares.

5 Ejemplos de invertebrados incluyen células vegetales y células de insecto. Numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células hospederas permisivas de insectos, de hospederos como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de las frutas), y *Bombyx mori* se han identificado. Una
10 variedad de cepas virales de transfección están a disposición del público, por ejemplo, la variante *Autografa californica* VPN y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* VPN, y tales virus pueden ser utilizados como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células *Spodoptera frugiperda*.

15 Los cultivos de células de plantas de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate y tabaco también pueden ser utilizados como hospederos.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en las células de vertebrados, y la propagación de las células de vertebrados en el cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos útiles de las líneas celulares

20 de mamíferos hospederos son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón de embriones humanos (por ejemplo, células subclonadas 293 o 293 para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y otros, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebé hamster (BHK, por ejemplo, ATCC CCL 10), células de ovario de hámster chino /-
25 DHFR (CHO, Urlaub y otros, Proc. Natl. Acad. SCL US 77:4216 (1980)), incluyendo pero no se limitan a CHO K1, CHO pro3 ", DG44 CHO, CHO DUXBI 1, Lec13, B-Lyl, y DP12 células CHO, CHO, preferentemente, un DUX (DHFR-) o un subclon de ellos (en lo sucesivo denominado "CHO DUX"); células C127, células de ratón L; células LTK, células Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod.
30 23:243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde de África (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK,

ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W 138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), las células de mieloma de ratón; NSO; células de hibridoma, como células de hibridoma de ratón; células COS, células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y otros, Annals KY. Acad. SCL 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4, y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospederas se transforman con vectores de expresión o de clonación para la producción de anticuerpos que se unen a LT α descritos en la presente especificación, y son cultivadas en medios convencionales nutrientes modificados, según proceda, para la inducción de los promotores, la selección de transformadores, o la amplificación de los genes de codificación de las secuencias deseadas.

Cultivo de las células hospederas

Las células hospederas utilizadas para producir un anticuerpo para la presente invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 (Sigma) de Ham, Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células hospederas. Además, cualquiera de los medios que se describe en Ham y otros, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y otros, Anal. Biochem.102: 255 (1980), US 4767704, 4657866, 4927762, 4560655, o 5122469; WO 1990/03430; WO 1987/00195; o Re US. 30985 pueden utilizarse como medios de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios pueden ser suplementados cuando sea necesario, con las hormonas y/o otros factores de crecimiento (como la insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), los buffers (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (tal como, el fármaco gentamicina™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes en las concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquiera de otros suplementos necesarios pueden también ser incluidos en las concentraciones adecuadas que serán conocidas por aquellos

expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, etc, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedera seleccionada para la expresión, y serán evidentes normalmente para el experto en la materia.

En un aspecto particular, un medio adecuado contiene un componente de medio
5 basal tal como DMEM/HAM F-12 basados en la formulación (para la composición de medios DMEM y HAM F12 y, sobre todo, medios libre de suero, ver formulaciones de medios de cultivo en la *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, Sexta Edición, 1988, páginas 346 - 349) (la formulaciones de los medios, tal como se describe en US 5,122,469 pueden
10 ser apropiadas) con concentraciones adecuadamente modificadas, en caso necesario, de algunos componentes como aminoácidos, sales, azúcares y vitaminas, y opcionalmente conteniendo glicina, hipoxantina y timidina; insulina humana recombinante, peptona hidrolizada, tales como la peptona™ 2 y 3 proteasa, PRIMATONE HS™ o PRIMATONE RL™ (Difco, US; Sheffield,
15 Inglaterra), o su equivalente; un agente de protección de células, como PLURONIC F68™ o el equivalente poliol PLURONIC™; antibiótico gentamicina™, y oligoelementos. Preferentemente el medio de cultivo de células es libre de suero.

En uno de los aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a
20 cabo en gran cantidad por un proceso de fermentación. Varios procedimientos de fermentación alimentada en lotes a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen por lo menos unos 1000 litros de capacidad, de preferencia de 1000 a alrededor de 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores
25 agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala, se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador de que no tiene mas de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede ir desde alrededor de un litro hasta alrededor de 100 litros.

30 En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión proteica se suele iniciar después de que las células se han cultivado en condiciones adecuadas para una densidad deseada, por ejemplo, una OD₅₅₀ de aproximadamente unos

180-220, momento en el que las células están en la primera fase estacionaria. Una variedad de inductores pueden ser utilizados, de acuerdo con la construcción de los vectores empleados, como es conocido en el arte y se ha descrito anteriormente. Las células pueden ser cultivadas por períodos más cortos antes
 5 de la inducción. Las células generalmente son inducidas durante unas 12-50 horas, aunque se puede utilizar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de la producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, diferentes condiciones de fermentación pueden ser modificadas. Por ejemplo, para mejorar el correcto montaje y plegado de los polipéptidos de
 10 anticuerpos secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que sobre-expresan proteínas chaperonas, como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, y DsbD o DsbG) o FkpA (un peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células hospederas procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el correcto plegamiento y la
 15 solubilidad de proteínas heterólogas bacterianas producidas en las células hospederas. Chen y otros, J Bio Chem. 274: 19601-19605 (1999); US 6083715 y 6027888; Bothmann y Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17100-17105 (2000); Ramm y Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17106-17113 (2000), y Arie y otros, el MDI. Microbiol. 39: 199-210 (2001).

20 Para reducir al mínimo la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (sobre todo las que son proteolíticamente sensibles), algunas cepas hospederas deficientes de enzimas proteolíticas pueden ser utilizadas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células hospederas pueden ser modificados a efecto de mutación(es) genética(s) en los genes que codifican proteasas
 25 bacterianas conocidas como proteasa III OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, proteasa V, la proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes de proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en US 5264365; 5508, 192; y Hara y otros, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996). En una realización, las cepas de *E. coli* deficientes de enzimas
 30 proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobre-expresan una o más proteínas chaperonas se utilizan como células hospederas en el sistema de expresión de presente especificación.

Purificación de anticuerpos

Al utilizar técnicas de recombinación, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, en un primer paso, los desechos de partículas, ya sea
5 células hospederas o fragmentos de lisis, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general, primero se concentran utilizando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON™ o Millipore
10 PELLICON™. Un inhibidor de la proteasa como fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis, y los antibióticos pueden ser incluidos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

En una realización, la proteína del anticuerpo producida en la presente
15 especificación es nuevamente purificada para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Métodos estándar de purificación de proteínas conocidos en el arte pueden ser empleados. Los siguientes procedimientos son ejemplos adecuados de los procesos de purificación: cromatografía de hidroxilapatite, cromatografía de heparina
20 SEPHAROSE™, electroforesis en gel, diálisis, fraccionamiento en columnas de immunoafinidad, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de sílice, cromatografía en un anión o en una resina de intercambio catiónico (como DEAE o una columna de ácido poliaspartico), cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, y filtración de gel utilizando, por ejemplo,
25 resina de G-75 SEPHADEX™. La cromatografía de afinidad es una técnica de purificación preferida. Para la purificación de escala analítica se emplean grandes volúmenes, los volúmenes más pequeños se pasan a través de las columnas y se utilizan, para purificación preparativa o en escala comercial, para producir cantidades de anticuerpos útiles en aplicaciones terapéuticas. El experto en la
30 materia incluirá cual escala se debe utilizar para la aplicación. Preferiblemente, se emplea la escala preparativa para esta invención.

La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Una proteína puede ser utilizada para purificar los anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark y otros, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (GUSS y otros, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se adjunta es en la mayoría de los casos agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinilo) benceno permiten un flujo más rápido y tiempos más cortos de procesamiento que pueden lograrse con agarosa. En caso de que el anticuerpo incluya un dominio CH3, la resina BAKERBOND ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey) es útil para la purificación.

Para una cromatografía de Proteína A, la fase sólida a la que la proteína A es inmovilizada es preferiblemente una columna que incluye una superficie de vidrio o de sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha revestido con un reactivo, como el glicerol, para impedir la adhesión inespecífica de los contaminantes. La fase sólida es lavada para eliminar los contaminantes no específicamente enlazados a la fase sólida. Por último, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Tras los primeros pasos de purificación, la mezcla de los anticuerpos de interés y los contaminantes pueden ser sometidos a cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un buffer de elución a un pH entre 2,5-4,5, de preferencia realizada a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de alrededor de 0 a 0,25 M de sal).

Variante de generación de anticuerpos que exhiben una respuesta HAMA reducida o ausente

La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de los agentes terapéuticos adecuados. Véase, por ejemplo, Khaxzaeli y otros., J. Natl. Inst. cáncer., 80:937 (1988); Jaffers y otros, Trasplante, 41:572 (1986); Shawler y otros, J. Immunol, 135: 1530 (1985), Sears y otros., J.

Biol. Response Mod., 3: 138 (1984), Miller y otros, Blood, 62:988 (1983); Hakimi y otros, J. Immunol, 147: 1352 (1991); Reichmann y otros, Nature, 332:323 (1988) y Junghans y otros, Cancer Res., 50: 1495 (1990). En algunas realizaciones referidas, la invención proporciona anticuerpos humanizados de forma tal que la
5 respuesta HAMA es reducida o eliminada. Variantes de estos anticuerpos pueden además ser obtenidas por medio de los métodos conocidos en el arte, algunos de los cuales se describen más adelante.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se describe en la presente especificación puede servir como base de partida (padre) para la
10 secuencia del marco de diversificación y/o secuencia(s) CDR. Una secuencia de marco seleccionada a la cual está vinculada la secuencia CDR de inicio, se refiere en el presente documento como un marco humano aceptor. Mientras que los marcos humanos aceptores pueden ser, o derivarse de una inmunoglobulina humana (regiones VL y/o VH), preferentemente el marco humano aceptor es, o
15 está derivados de una secuencia del marco de consenso humano, debido a que se ha demostrado que tales marcos presentan una inmunogenicidad mínima, o nula, en pacientes humanos.

Cuando el aceptor se deriva de una inmunoglobulina humana, opcionalmente se puede seleccionar una secuencia de marco humano sobre la base de su
20 homología con la secuencia de marco de donantes a través de la alineamiento de la secuencia de marco de donantes humanos con diversas secuencias de marco humano en una colección de secuencias de marco humano y seleccionando la secuencia de marco más homóloga como aceptante.

En una realización, el marco de consenso humano en la presente especificación
25 es, o está derivada de, secuencias del marco de consenso de subgrupo III VH y/o subgrupo kappa I VL.

Así pues, el marco humano aceptor VH podrá incluir uno, dos, tres, o todas de las siguientes secuencias de marco:

- FR1 que incluye EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (ID SEC NO: 46),
- 30 FR2 que incluye WVRQAPGKGLEWVG (ID SEC NO: 47),

FR3 que incluye RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR (ID SEC NO: 48), o RATFSADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAD (ID SEC NO: 50),
y FR4 que incluye WGQGTLTVSS (ID SEC NO: 49). El marco humano aceptor VL podrá incluir uno, dos, tres, o todas de las siguientes secuencias de marco:

5 FR1 que incluye DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (ID SEC NO: 51),
FR2 que incluye WYQQKPGKAPKLQIY (ID SEC NO: 52), o WYQQKPGKAPKLLIY (ID SEC NO: 55),
FR3 que incluye GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (ID SEC NO: 53), y

10 FR4 que incluye FGQGTKVEIKR (ID SEC NO: 54).

Mientras que el aceptor puede ser idéntico en secuencia a la secuencia de marco humano seleccionada, tanto si se obtiene de una inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, la presente invención contempla que la secuencia aceptor puede incluir sustituciones de aminoácidos preexistentes

15 relativas a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de marco de consenso humano. Estas sustituciones preexistentes son de preferencia mínima, por lo general, sólo cuatro, tres, dos, o un aminoácido de diferencia con respecto a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de marco de consenso.

Los residuos CDR del anticuerpo no humano se incorporan a los marcos

20 humanos aceptores VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos de los CDR de Kabat, los residuos del lazo hipervariable de Chothia, residuos AbM, y/o residuos de contacto. Opcionalmente, la ampliación de residuos CDR se incorporan como sigue: 24 - 34 (local), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (de H2) y 93-102, 94-102, y 95-102

25 (H3).

La "incorporación" de residuos CDR se puede lograr de varias maneras, por ejemplo, se puede generar ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada por la mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable de ratón a fin de que los residuos de marco sean por lo tanto

30 cambiados a residuos de marco humano aceptor, o por mutación de ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humano para que los

residuos CDR se cambien a residuos no humanos, o por síntesis de ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

La variantes de CDR injertadas pueden ser generadas por mutagénesis Kunkel de ácido nucleico que codifica la secuencia humana aceptora, utilizando un
5 oligonucleótido para cada CDR. Kunkel y otros, *Enzymol Methods*. 154:367-382 (1987). Los cambios apropiados pueden ser introducidos dentro del marco y/o CDR, utilizando técnicas de rutina, para corregir y restablecer la correcta interacción antígeno-CDR.

La tecnología de exposición en fagémidos (también en lo sucesivo referida como,
10 exposición en fagos, en algunos contextos) puede utilizarse como un método rápido y conveniente para la generación y selección de diferentes anticuerpos variantes en una biblioteca generada por la aleatorización de secuencia. Sin embargo, otros métodos para lograr y cribar anticuerpos alterados están a disposición de la persona cualificada.

15 La tecnología de exposición en fagémidos ha proporcionado un poderoso instrumento para la generación y selección de nuevas proteínas que se unen a un ligando, tal como un antígeno. Utilizando las técnicas de exposición en fagémidos permite la generación de grandes bibliotecas de variantes de proteínas que pueden ser ordenadas rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una
20 molécula objetivo con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes están generalmente enfocados a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside viral, tales como la proteína del gen III o proteína del gen VIII.

Sistemas de exposición en fagémidos monovalentes donde la secuencia de ácido
25 nucleico que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la proteína del gen III han sido desarrollados. (Bass, *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzimology*, 3:205 (1991)). En un sistema de exposición en fagémidos monovalentes, la fusión génica se expresa en niveles
30 bajos y las proteínas de genes de tipo salvaje III también son expresadas de manera que la inefectividad de las partículas se conserva. Métodos de generación de bibliotecas de péptidos y de cribado de esas bibliotecas se han divulgado en

numerosas patentes (por ejemplo US 5723286; 5432, 018, 5580717, 5427908 y 5498530).

Las bibliotecas de anticuerpos se han preparado en una serie de maneras, que incluyen la alteración de un gen mediante la inserción de secuencias de ADN al
5 azar o mediante la clonación de una familia de genes relacionados.

Métodos de exposición de anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos utilizando exposición en fagémidos se describen en US 5750373, 5733743, 5837242, 5969, 108, 6, 172, 197, 5580717 y 5658727. La biblioteca es entonces
10 cribada para detectar la expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígenos con las características deseadas.

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codón diseñados para los residuos CDR a ser alterados. Un conjunto de codón es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos distintos utilizados para codificar los aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codón se pueden
15 representar mediante símbolos para designar nucleótidos particulares o equimolar mezclas de nucleótidos como se muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

- G Guanina
- 20 A Adenina
- T Timina
- C Citosina
- R (A o G)
- Y (C o T)
- 25 M (A o C)
- K (G o T)
- S (C o G)
- W (A o T)
- H (A o C o T)

B (C o G o T)
V (A o C o G)
D (A o G o T)
H N (A o C o G o T)

5 Por ejemplo, en el conjunto de codón establecido DVK, D puede ser nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C, y K puede ser G o T. Este conjunto de codón puede presentar 18 diferentes codones y puede codificar aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, ASN, Lys, Ser, Arg, Asp, Gln, Gly, y Cys.

10 Los conjuntos de oligonucleótidos o cebadores pueden ser sintetizados utilizando métodos estándar. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, que incluye secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codón y que codifica el grupo de los aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" del nucleótido seleccionado en ciertas
15 posiciones es bien conocida en el arte. Tales conjuntos de nucleótidos que presenten determinados conjuntos de codón pueden ser sintetizados utilizando sintetizadores comerciales de ácido nucleico (disponibles a partir de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se puede obtener comercialmente (por ejemplo, Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de
20 oligonucleótidos sintetizados con un conjunto de codón particular suelen incluir una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferencias son establecidas por el conjunto de codón dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, tal como se utilizan en la presente especificación, tienen secuencias que permiten la hibridación a una molde de ácido nucleico de dominio
25 variable y también puede incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

En un método, las secuencias de codificación de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes pueden ser creadas por mutagénesis mediante oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en el arte, tal como se describe
30 por Zoller y otros Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987). En pocas palabras, las secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos variantes son

creadas por un hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los conjuntos deseados de codón a una molde de ADN, donde la molde se encuentra en forma de hebra simple del plásmido que contiene una secuencia de molde de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, la polimerasa de ADN se utiliza para sintetizar toda una segunda hebra complementaria de la
5 molde que incorporará el primer oligonucleótido, y contendrá el conjunto de codón según lo previsto por el conjunto de oligonucleótidos.

En general, se utilizan los oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son
10 totalmente complementarios a la molde de cada lado de lo(s) nucleótido(s) que codifican para la(s) mutación(es). Esto asegura que el oligonucleótido se hibride adecuadamente a la molécula molde de ADN de hebra simple. Los oligonucleótidos son sintetizados fácilmente utilizando técnicas conocidas en el arte como en *Crea y otros, Proc. Natl Acad. Sci. US, 75:5765 (1978)*.

15 La molde de ADN es generada por los vectores que se derivan de los vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles comercialmente son adecuados), o que contengan un origen de fago de hebra simple, tal como se describe por *Viera y otros, Meth. Enzymol, 153:3 (1987)*. Por lo tanto, el ADN a ser mutado se puede insertar en uno de estos vectores para generar una molde
20 de hebra simple. La producción de una molde de hebra simple se describe en las secciones 4.21-4.41 *Sambrook y otros, supra*.

Para modificar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibridó a la molde de hebra simple en condiciones adecuadas de hibridación. Una enzima de polimerización de ADN, por ejemplo, la polimerasa de ADN T7 o el fragmento
25 Klenow de la polimerasa 1 de ADN, se añade a continuación para sintetizar la hebra complementaria de la molde utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Una molécula heterodúplex se forma de tal manera que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1, y la otra rama (la molde original) codifica la secuencia nativa, sin alterar el gen 1. Esta molécula
30 Heterodúplex se transforma en una célula hospedera adecuada, por lo general una procariota como *E. coli* JM101. Después de crecer las células, éstas son plaqueadas en placas de agarosa y examinadas utilizando el cebador de

oligonucleótido radiomarcado con fosfato ^{32}P para identificar las colonias bacterianas que contengan las mutaciones del ADN.

El método descrito inmediatamente arriba podrá ser modificado de tal manera que una molécula homoduplex se crea donde ambas hebras del plásmido contienen la(s) mutación(es). Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de hebra simple es templado en el molde de hebra simple como se ha descrito anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, deoxyriboadenosine (dATP), deoxyriboguanosine (dGTP), y deoxyribothymidine (dTTP), se combina con una modificación de tiodeoxyribocitosina llamada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras la adición de la polimerasa de ADN a esta mezcla, se genera una hebra de ADN idéntica a la molde a excepción de las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión de endonucleasa de restricción. Luego de que la hebra del heterodúplex de doble hebra es cortado con una enzima de restricción, la hebra de la molde puede ser digerida con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio(s) que será mutagenizado. La reacción se detuvo entonces para dejar una molécula que es sólo parcialmente de hebra simple. Un homoduplex de ADN de doble hebra se forma utilizando la polimerasa de ADN en presencia de los cuatro trifosfatos deoxyribonucleotide, ATP, y la ligasa de ADN. Esta molécula Homoduplex puede ser transformada en una célula hospedera adecuada.

Como se indicó anteriormente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de una longitud suficiente para hibridizar a la molde de ácido nucleico y puede además, pero no necesariamente, contener sitios de restricción. La molde de ADN puede ser generada por los vectores que son derivados de los vectores del bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de fagos de hebra simple de replicación como se describe por Viera y otros. *Meth. Enzymol*, 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que será mutado debe ser insertado en uno de estos vectores, a fin de generar una molde de hebra simple. La producción de una molde de hebra simple se describe en las secciones de 4.21-4.41 *Sambrook y otros, supra*.

En otro método, una biblioteca puede ser generada proporcionando conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, cada uno con una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias.

Estas secuencias son establecidas por los conjuntos de codón dentro de la
5 secuencia de oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótido corriente arriba y corriente abajo, junto con una secuencia de ácido nucleico de molde de dominio variable, pueden ser utilizados en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) para generar una "biblioteca" de productos PCR. Los productos PCR pueden ser denominados como "casetes de ácido nucleico", ya que pueden ser fusionados
10 con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, las proteínas de la cápside viral y dominios de dimerización, establecidos mediante técnicas de biología molecular.

La secuencia de los cebadores PCR incluyen uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles a solvente y altamente
15 diversas en un CDR. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codón es un conjunto de diferentes secuencias de nucleótidos triplete utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados.

Los selectantes de anticuerpos que cumplan con los criterios deseados, seleccionados a través de un examen adecuado y pasos de selección, pueden ser
20 aislados y clonados utilizando técnicas de recombinación.

Ensayos de actividad.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas y químicas y funciones biológicas de diversos ensayos conocidos en la materia.

25 Las inmunoglobulinas purificadas pueden estar caracterizadas por una serie de ensayos, incluyendo pero no limitándose a, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión con exclusión de tamaño de no-desnaturalización (HPLC), espectrometría de masa, cromatografía de intercambio iónico, y digestión de papaína.

30 En determinadas realizaciones de la invención, se analiza la actividad biológica los anticuerpos producidos en la presente especificación. En algunas

realizaciones, se comprueba la actividad de unión de los anticuerpos de presente especificación al antígeno. El ensayo de unión de antígeno conocido en el arte y útil en la presente especificación incluye, pero no se limita a, cualquier ensayo directo o de unión competitiva utilizando técnicas tales como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inunisorbente ligado a enzimas), inunioensayos "sandwich", ensayos de inunoprecipitación, inunioensayos fluorescentes, e inunioensayos de proteína A.

En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo convierten en un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la vida media de los anticuerpos *in vivo* es importante, sin embargo, ciertas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En determinadas realizaciones, las actividades de la Fc de la inmunoglobulina producida se miden para garantizar que sólo las propiedades deseadas se mantienen. Ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden llevarse a cabo para confirmar la reducción o el agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión a receptores Fc (FCR) pueden llevarse a cabo para garantizar que los anticuerpos carezcan de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carecen de actividad ADCC), pero conservan la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de *Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en US 5500362 o 5821337. Las células efectoras útiles para estas determinaciones son células PBMCs y NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, como el que se divulga en Clynes y otros. *PNAS (US)* 95:652-656 (1998). Ensayos de unión a C1Q también pueden ser llevadas a cabo para confirmar que el anticuerpo no es capaz de unirse a C1Q y, por tanto, carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en *Gazzano-Santoro y otros., J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). La determinaciones de unión a FcRn y de la eliminación y vida

media in vivo también se pueden realizar utilizando los métodos conocidos en el arte.

Variantes de anticuerpos

En algunas realizaciones, la(s) modificación(es) de secuencia de aminoácidos de
5 los anticuerpos descritos en la presente especificación se contemplan. Por
ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad y/u otras propiedades biológicas
de los anticuerpos. Las variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos
se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en
10 los ácidos nucleicos del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Dichas
modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o
sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del
anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución se hace
para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las
características deseadas. Las modificaciones de aminoácidos podrán introducirse
15 en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que la
secuencia se hace.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones de los
anticuerpos que son sitios preferidos para la mutagénesis se llama "mutagénesis
de escaneo de alanina" descrita por *Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-*
20 *1085 (1989)*. En la presente especificación, se identifican un residuo o grupo de
residuos destinatarios (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, su,
lys y glu) y sustituido por un aminoácido neutral o con carga negativa (más
preferentemente alanina o polialanine) para afectar la interacción de los
aminoácidos con el antígeno. Los sitios de aminoácidos que demuestran una
25 sensibilidad funcional a las sustituciones son refinados posteriormente mediante
la introducción de nuevas u otras variantes, o para los sitios de sustitución. Así
pues, si bien el sitio para la introducción de una variación de secuencia de
aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no
tiene que ser determinada de antemano. Por ejemplo, para analizar el desempeño
30 de una mutación en un sitio determinado, la exploración aleatoria o mutagénesis
aleatoria se lleva a cabo en el codón o región objetivo y las inmunoglobulinas
expresadas se criban para la actividad deseada.

- Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones terminales de aminoácidos y/o carboxilo que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen un centenar o más de residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales
- 5 incluyen un anticuerpo con un residuo de metionil N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de la inserción de moléculas de anticuerpos incluyen la fusión a la terminal N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero de los anticuerpos.
- 10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen los CDRs, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se despliegan en el cuadro A en el
- 15 epígrafe de "sustituciones preferidas". Si esas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica y, a continuación, más cambios importantes, denominados de "sustitución ejemplar" en el cuadro A, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, pueden ser introducidos y los productos seleccionados.

20

TABLA A

Residue Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp

Gly (G)	Ala	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	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

- Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos se logra mediante la selección de sustituciones que difieren considerablemente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido en el ámbito de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio de destino, o (c) la carga de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo a las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (como se describe, por ejemplo, en *A.L. Lehninger, Biochemistry*, segunda edición.,
- 5 Págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):
- 10 (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- 15 (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos de aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos en función de las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

5 (3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que tienen influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de
10 una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden ser introducidos en los sitios de sustitución conservadora o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservadores).

Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos CDR de un anticuerpo padre (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o
15 humanos). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para un ulterior desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo padre a partir del cual se generan. Una manera conveniente para la generación de tales variantes de sustitución implica la maduración de afinidad utilizando exposición en fagos. En resumen, varios sitios CDR (por ejemplo, sitios
20 6-7) son mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados por lo tanto, se despliegan a partir de partículas de fagos filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 envasados dentro de cada partícula. Las variantes de exposición en fagos mostradas a continuación son seleccionadas por su actividad biológica (por
25 ejemplo, afinidad), como en la presente especificación se divulga. Para la ubicación de los sitios CDR candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis de exploración de alanina para identificar los residuos de CDR que contribuyen significativamente a la unión con el antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, podría ser beneficioso analizar una estructura cristalina del

complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos a la sustitución, de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente especificación. Una vez que esas variantes son generadas, el grupo de variantes se somete a
5 una selección como se describe en la presente especificación y pueden ser seleccionados anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo ulterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo son preparadas mediante una variedad de métodos
10 conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de la presencia natural de variantes de secuencia de aminoácidos) o la preparación mediante mutagénesis de oligonucleótidos mediada (o dirigida a sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de una variante anteriormente preparada o una versión no variante del
15 anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención tienen preferiblemente la región Fc de secuencia nativa. Sin embargo, puede ser conveniente introducir uno o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc, generando una variante de región Fc. La variante de región Fc puede incluir una secuencia de región Fc
20 humana (por ejemplo, una región humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Fc), que incluye una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en uno o varios aminoácidos, entre ellos las posiciones de cisteína de la bisagra. Estos anticuerpos, no obstante, mantienen sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con sus homólogos de tipo
25 salvaje.

Tales sustituciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, mejorar o reducir otras funciones Fc o mejorar la misma función Fc, aumentar la afinidad de unión al antígeno, aumentar la estabilidad, alterar la glicosilación, o incluir variantes alotípicas. Los anticuerpos pueden incluir una o más sustituciones de
30 aminoácidos en la región Fc que den como resultado que el anticuerpo exhiba una o más de las propiedades seleccionadas a partir de un aumento de unión a FcγR, aumento de ADCC, aumento de los CDC, disminución de CDC, aumento

de la función ADCC y CDC, aumento de ADCC pero disminución de la función CDC (por ejemplo, para minimizar la reacción de perfusión), aumento de unión a FcRn, y un aumento de vida media en suero, en comparación con los mismos anticuerpos que tienen las regiones Fc de tipo salvaje. Estas actividades se
5 pueden medir por los métodos descritos en la presente especificación. Por ejemplo, véase el WO 1999/51642. Véase también *Duncan y Winter, Nature* 322:738-40 (1988); US 5648260; US 5624821 y WO 1994/29351 en relación con otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

Para obtener más alteraciones de aminoácidos que mejoren la función Fc, véase,
10 por ejemplo, US 6737056. Cualquiera de los anticuerpos de la presente invención puede además incluir al menos una sustitución de aminoácidos en la región Fc que disminuye la actividad de CDC, por ejemplo, incluyendo al menos la sustitución K322A. Véase US 6.528.624 (*Idusogie y otros*).

En otra realización preferida, el anticuerpo tiene sustituciones de aminoácidos en
15 una o cualquier combinación de posiciones que son 268D, o 298A, o 326D, o 333A, 334A o, junto con 298A o 333A, 298A y 334A, junto con, o junto 239d con 332E, junto con 239d o 298A y 332E, o 239d junto con 268D y 298A y 332E, o 239d junto con 268D y 298A y 326A y 332A, 239d o junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 239d junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o 239d junto con
20 268D y 283L y 298A y 326A y 332E, o 239d junto con 330L y 272Y y 332E y 256E y 254T, o 250Q junto con 428L, o 265A, 297A o, en el que la sustitución 265A es, en ausencia de 297A y la sustitución 297A es, en ausencia de 265A. La letra después del número en cada una de estas designaciones representa el cambio de aminoácido en esa posición.

25 Las mutaciones que mejoran ADCC y CDC incluyen la sustitución de uno a tres posiciones de la región Fc, incluidas las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (Eu numeración de los residuos), especialmente S298A junto con E333A y K334A (S298A/E333A/K334A, o similarmente una combinación de 298A, 333A y 334A), también referido en la presente especificación como, el triple mutante Ala.
30 K334L aumenta la unión a CD16. K322A resulta en la reducción de actividad de CDC; K326A o K326W mejora la actividad CDC. D265A resulta en la reducción de la actividad ADCC.

Las variantes de estabilidad son variantes que despliegan una mayor estabilidad con respecto a, por ejemplo, la oxidación y deamidación.

Otro tipo adicional de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glicosilación del anticuerpo. Dicha modificación incluye la delección de una o varias fracciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en los anticuerpos. Las variantes de glicosilación que aumentan la función ADCC se describen, por ejemplo, en WO 2003/035835. Véase también US 2006/0067930.

La glicosilación de polipéptidos suele ser o bien N-enlazada o O-enlazada. La N-enlazada se refiere a la fijación de la fracción de carbohidratos a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripeptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido prolina excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la adhesión enzimática de la fracción de carbohidratos a la cadena lateral asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptidas en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación O-enlazada se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, xilosa o hidroxiamino a un ácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden ser utilizados 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de los sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las citadas secuencias tripeptidas (para los sitios de glicosilación N-enlazados). La modificación también podrá ser efectuada por la adición de, o la sustitución de, uno o más residuos de serina y treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-enlazados).

Cuando el anticuerpo incluye una región Fc, el carbohidrato adjunto a la misma puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos maduro que carece de fucosa adjunta a una región Fc del anticuerpo se describen en US 2003/0157108 (Presta). Véase también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc) en los carbohidratos adjuntos a una región Fc de los anticuerpos se hace referencia, por ejemplo, en WO 2003/011878,

Jean-Mairet y otros y US 6602684 (Umana y otros \.). Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido adjunto a una región Fc de los anticuerpos se presentan, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel y otros). Véase, también, WO 1998/58964 (Raju) y WO 1999/22764 (Raju), relativa a los anticuerpos con alteración de carbohidratos adjunto a la región Fc. Véase también
 5 US 2005/0123546 (Umana y otros.); US 2004/0072290 (Umana y otros); US 2003/0175884 (Umana y otros); WO 2005/044859 (Umana y otros), y US 2007/0111281 (Sondermann y otros) sobre moléculas de unión de antígeno con glicosilación modificada, incluyendo los anticuerpos con una región Fc que
 10 contiene oligosacáridos N-enlazados y US 2007/0010009 (Kanda y otros.)

Una variante preferida del anticuerpo de glicosilación en la presente especificación descrita, incluye una región Fc donde la estructura de carbohidratos adjunta a la región Fc tiene fucosa reducida o carencia total de fucosa, lo que puede mejorar la función ADCC. En concreto, en la presente
 15 especificación se contemplan los anticuerpos que tienen fucosa reducida en relación con la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo producido en células CHO de tipo salvaje. Es decir, que se caracterizan por tener una menor cantidad de fucosa de lo que, de otro modo, tendrían si se hubieran producido por células CHO nativa. Preferentemente el anticuerpo es aquel en el que menos de un 10%
 20 de los glicanos N-enlazados incluyen fucosa, más preferiblemente menos de un 5% de los glicanos N-enlazados incluyen fucosa, y la mayor preferencia, en el que ninguno de los glicanos N-enlazados incluyen fucosa, es decir, que el anticuerpo está completamente libre de fucosa, o no tiene fucosa.

Estos anticuerpos "defucosilados" o "deficientes de fucosa" pueden ser
 25 producidos, por ejemplo, mediante el cultivo de los anticuerpos en una línea celular como la divulgada, por ejemplo, en US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614, 2002/0164328 US; US 2004/0093621, 2004/0132140 US; US 2004/0110704, 2004/0110282 US; US 2004/0109865; WO 2003/085119, WO 2003/084570, WO 2005/035586; WO 2005/035778;
 30 WO2005/053742; US 2006/0063254, 2006/0064781 US; US 2006/0078990, 2006/0078991 US; Okazaki y otros J. Mol Biol. 336: 1239-1249 (2004), y Yamane-Ohnuki y otros, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas de células

- productoras de anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka y otros. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 2003/0157108 AI US (Presta) y WO 2004/056312 A1 (Adams y otros, especialmente en Ejemplo 11) y líneas celulares de eliminación, como la
- 5 alfa-1, gen de 6-fucosiltransferase, células CHO FUT8 de eliminación (Yamane-Ohnuki y otros, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)). Véase también Kanda y otros, Biotechnol. Bioeng., 94: 680-8 (2006). US 2007/0048300 (Biogen-IDEC) revela un método de producción de polipéptidos aglicosilado que contienen Fc, tales como anticuerpos, que tienen la función efectora deseada, así como anticuerpos
- 10 aglicosilados producidos de acuerdo con el método y los métodos de utilización de estos anticuerpos de forma terapéutica, que se aplican en la presente especificación. Adicionalmente, US 7262039 se refiere a un polipéptido con una actividad 3-fucosiltransferasa, alfa-1, que incluya un método para producir una cadena de azúcar que contiene fucosa utilizando el polipéptido.
- 15 Véase también US 2006/024304 (Gerngross y otros); patente de US N ° 7029872 (Gerngross); US 2004/018590 (Gerngross y otros); US 2006/034828 (Gerngross y otros); US 2006/034830 (Gerngross y otros) ; US 2006/029604 (Gerngross y otros.) WO 2006/014679 (Gerngross y otros); WO 2006/014683 (Gerngross y otros); WO 2006/014685 (Gerngross y otros); WO 2006/014725 (Gerngross y
- 20 otros), y WO 2006/014726 (Gerngross y otros.) sobre glicoproteínas recombinantes y variantes de glicosilación que se aplican en la presente especificación.

En otra realización, la invención proporciona una composición de anticuerpos que incluyen los anticuerpos descritos en el presente documento que tienen una

25 región Fc, donde alrededor de 20-100% de los anticuerpos en la composición incluyen estructura de núcleo maduro de carbohidratos en la región Fc que carece de una fucosa. De preferencia, por ejemplo, la composición incluye anticuerpos que tengan una región Fc que ha sido alterada para cambiar una o más de las citotoxicidades mediadas por células dependientes de los anticuerpos y (ADCC),

30 la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), o las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos para una secuencia Fc IgG de tipo salvaje mediante la sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en

A, D, E, L, Q, T, y Y, en una o cualquier combinación de posiciones de la región Fc seleccionada del grupo consistente en: 238 , 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292 , 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 5 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334 , 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438 y 439.

La composición es más preferiblemente un anticuerpo que incluye además la sustitución de un Fc que es 268D o 326D junto con 333A o 334A, 298A y 333A, 10 junto con, o 298A, junto con 334A, junto con 239d o 332E, junto con 239d o 298A y 332E , junto con 239d o 268D y 298A y 332E, o 239d junto con 268D y 298A y 326A y 332A, o 239d junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 239d junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o junto 239d con 268D y 283L y 298A y 326A y 332E, junto con 239d o 330L y 332E, donde la letra después del número en cada 15 una de estas designaciones representa el aminoácido cambiado en esa posición.

La composición es, además, de preferencia una donde el anticuerpo se une a FcγRIII. La composición es más preferida de manera tal que el anticuerpo tenga una actividad ADCC en presencia de células efectoras humanas o tenga una actividad ADCC incrementada en presencia de células efectoras humanas en 20 comparación con el mismo anticuerpo que incluya una región IgG1Fc humana de tipo salvaje.

La composición también es preferiblemente, una donde el anticuerpo se une a FcγRTIII con la mejor afinidad, o medie la ADCC de manera más efectiva, que una glucoproteína con una estructura de núcleo maduro de carbohidratos 25 incluyendo fucosa adjunta a la región Fc de la glicoproteína. Además, la composición es de preferencia un anticuerpo que se ha producido por una célula CHO, preferentemente una célula Lec13. La composición también es de preferencia una en la que el anticuerpo se ha producido a partir de células de mamífero que carecen de un gen de fucosiltransferase, más preferiblemente el 30 gen FUT8.

En un aspecto, la composición es un anticuerpo que está libre de N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

Alternativamente, la composición es aquella en la que el anticuerpos tiene una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

En otro aspecto, la composición es aquella en la que un anticuerpo que tiene uno o más residuos de galactosa unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

10 Alternativamente, la composición es aquella en la que el anticuerpo está libre de uno o más residuos de galactosa unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

En otro aspecto adicional, la composición es aquella en la que un anticuerpo tiene uno o más residuos de ácido siálico unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

Alternativamente, la composición es aquella en la que el anticuerpo está libre de uno o más residuos de ácido siálico unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.

Esta composición, preferiblemente incluye como mínimo, aproximadamente el 2% de anticuerpos fucosilados.

La composición de más preferencia incluye como mínimo cerca de un 4% anticuerpos afucosilados. La composición incluye aún más preferiblemente al menos un 10% de anticuerpos afucosilados. La composición incluye aún más preferiblemente al menos un 19% de anticuerpos afucosilados.

25 La composición incluye aún más preferiblemente al menos un 100% de anticuerpos afucosilados.

Inmunconjugados

La invención también se refiere a inmunconjugados, o conjugados de fármacos con anticuerpos (ADC de sus siglas en Ingles), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un
5 fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o de un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de anticuerpos conjugados a fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo los fármacos que se utilizan para
10 matar o inhibir las células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278) permite dirigir selectivamente la administración de la fracción de fármaco hacia los tumores, y una acumulación intracelular de estos, donde la administración
15 sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col, (1986) *Lancet* págs. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al., (eds), págs. 475-506 (1985)). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles para estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la
25 vindesina. Entre las toxinas utilizadas en los conjugados de anticuerpos con toxinas se incluyen toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas de plantas, tales como la ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al., (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028;
30 Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213 y Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al., (1993)

Cancer Res. 53:3336-3342). Sin estar limitada a una teoría, las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando son

5 conjugados con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales immunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de éstas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena A de

10 la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, la cadena A de alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), el inhibidor de la *Momordica charantia*, la curcina, crotina, el inhibidor de la *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la

15 fenomicina, la enomicina, y el tricotecenos. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes bifuncionales acopladores de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP),

20 iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (tales como, disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como, glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como, 2,6-diisocianato de

25 tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (como 1,5-diflúor -2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una immunotoxina con ricina puede ser preparada como se describe en Vitetta y otros., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopenta-acético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un excelente agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un

30 anticuerpo. Véase, por ejemplo, WO 1994/11026.

También se contemplan en la presente especificación conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una

caliqueamicina, maitansinoide, un tricoteceno y un CC1065, y los derivados de estas toxinas que tengan una actividad tóxica.

En los ADCs de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga a una o más porciones de un fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente de 1 a 20 porciones de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El ADC de la Fórmula I puede ser preparado por varias vías, empleando las reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar un Ab-L, a través de un enlace covalente, seguida por la reacción con una fracción del fármaco D, y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo.

Ab-(L-D) p

Fórmula I

15

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a ellos:

(i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de las porciones del enlazador y los reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

25 Ciertos anticuerpos contienen disulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol.

30

- Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrofílicas, las cuales pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o en el fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados
- 5 pueden ser oxidados, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o de las fracciones de fármaco. Los grupos resultantes imina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina
- 10 estables. En una forma de realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (*Domen y col., J. Chromatog., 510: 293-302 (1990)*). En otra forma de realización, las proteínas que
- 15 contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con el meta-periodate de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (*Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852*). Puede hacerse que este aldehído reaccione con la fracción de fármaco o un nucleófilo enlazador.
- 20 Del mismo modo, los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen, pero no están limitados a: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos
- 25 como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluros ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

Alternativamente, se puede obtener una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o

30 la síntesis de péptidos. El fragmento de ADN puede comprender regiones que codifiquen las dos porciones del conjugado respectivamente ya sea adyacentes

entre sí o separadas por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) para su utilización en el pretratamiento del tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor-anticuerpo, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ej., la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ej. un radionucleótido).

Los ADCs de la presente especificación se preparan, opcionalmente, con reactivos reticulantes, tales como, por ejemplo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en el arte y se encuentran disponibles. Los polímeros solubles en agua son, preferentemente, las fracciones adecuadas para la derivación de los anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, el polietilenglicol (PEG), los copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, el poli-1, 3-Dioxolano, poli -1, 3,6-Trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, óxido de prolipropileno/copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y pueden ser ramificados o no ramificados. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En

general, el número y/o el tipo de polímeros utilizados para la derivación se pueden determinar sobre la base de consideraciones, incluyendo entre otras, las propiedades particulares o las funciones de los anticuerpos a mejorar, si los anticuerpos derivados serán utilizados en un tratamiento terapéutico en
5 condiciones definidas, etc.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos utilizados en la presente invención se preparan para su conservación mezclando un anticuerpo con el grado de pureza deseado con moléculas transportadoras, excipientes o estabilizantes
10 opcionales y fisiológicamente aceptables (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)*), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos a los beneficiarios en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato y otros
15 ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, cloruro amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos como metil o propilparabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-Pentanol; y m-cresol), polipéptidos de bajo peso
20 molecular (aproximadamente menos de 10 residuos), proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, como EDTA;
25 azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa, o sorbitol; contra-iones de formación salina como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, los complejos proteínas-Zn); y/o surfactantes no iónicos como Tween™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Una nueva formulación y un método de administración de la presente
30 especificación comprende aquellos descritos, por ejemplo, en WO 2004/078140, incluida la tecnología ENHANZE™ para la distribución de fármacos (Halozyme Inc.). Esta tecnología se basa en una hialuronidasa humana recombinante

(rHuPH20). La rHuPH20 es una forma recombinante de la enzima humana natural aprobada por la FDA que borra temporalmente espacios en la matriz de los tejidos tales como la piel. Es decir, la enzima tiene la capacidad de descomponer el ácido hialurónico (AH), que es la sustancia similar a un gel para el llenado de los espacios y que es el principal componente de los tejidos en todo el cuerpo. Se supone que esta actividad aclarante de la rHuPH20 contribuye a una mejor distribución de fármacos mediante el incremento de la entrada de moléculas terapéuticas a través del espacio subcutáneo. Por lo tanto, cuando se combina o se formula junto con ciertos fármacos inyectables, esta tecnología puede actuar como un "machete molecular" para facilitar la penetración y dispersión de estos fármacos mediante la apertura temporal de canales de flujo bajo la piel. Las moléculas tan grandes como 200 nanómetros pueden pasar libremente a través de la matriz extracelular perforada, la cual recupera su densidad normal en aproximadamente 24 horas, lo que lleva a una plataforma de distribución de fármacos que no altera la estructura de la piel de forma permanente.

Por lo tanto, la presente invención incluye un método de distribución de un anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva a un tejido que contiene cantidades excesivas de glicosaminoglicano, donde dicho método comprende la administración de una glicoproteína hialuronidasa (sHASEGP) (esta proteína comprende un polipéptido hialuronidasa soluble neutral activo y al menos una porción de azúcar unida por enlace N, donde la porción de azúcar N-enlazada esta covalentemente unida a un residuo asparagina del polipéptido) al tejido en una cantidad capaz de degradar suficientemente los glicosaminoglicanos como para abrir canales de diámetro aproximadamente menor de 500 nanómetros; y la administración del anticuerpo al tejido que comprende los glicosaminoglicanos degradados.

En otra forma de realización, la invención incluye un método para aumentar la difusión de un anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva que se administra a un sujeto donde dicho método comprende la administración al sujeto de un polipéptido sHASEGP, en una cantidad suficiente para abrir o para formar canales menores que el diámetro de los anticuerpos, y la administración del anticuerpo, por lo cual la difusión de la sustancia terapéutica se incrementa. El

sHASEGP y el anticuerpo pueden administrarse por separado o simultáneamente en una formulación, y en orden consecutivo o al mismo tiempo. WO 1998/56418 describe ejemplos de formulaciones de anticuerpos anti-LT α , las cuales incluyen una formulación líquida multidosis que comprende el anticuerpo anti-LT α a 40 mg/ml, 25 mM de acetato, 150 mM de trehalosa, un 0,9% de alcohol bencílico, 0,02% en polisorbato 20 pH 5,0 que tiene una vida útil mínima de dos años de almacenamiento a 2-8⁰ C. Otra formulación anti-LT α de interés comprende 10 mg/ml de anticuerpo en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/mL de citrato de sodio dihidrato, 0.7mg/mL del surfactante POLYSORBATE 80 TM surfactante, y agua estéril para inyección, pH 6,5. Sin embargo, otra fórmula farmacéutica acuosa comprende 10-30 mM de acetato de sodio con pH entre 4,8 y 5,5 aproximadamente, preferentemente a pH 5.5, POLYSORBATE TM como surfactante en una cantidad de alrededor de 0.01-0.1% v/v, trehalosa en una cantidad de alrededor de 2-10% w/v, y alcohol bencílico como conservante (US 6,171,586). Algunas formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen, por ejemplo, en WO 1997/048041 y US 6,267,958 (*Andya y otros.*). Tales formulaciones liofilizadas pueden ser reconstituidas con un disolvente adecuado para una alta concentración de proteínas y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea a los mamíferos a ser tratados en la presente especificación .

Las formas cristalizadas del anticuerpo también se consideran. Véase, por ejemplo, US 2002/0136719 (*Shenoy y otros.*).

La formulación de la presente especificación también puede contener más de un compuesto activo (un segundo medicamento como se indica más arriba) según sea necesario para la indicación del tratamiento en particular, de preferencia aquellas con actividades complementarias que no afectan negativamente a los demás. Por ejemplo, puede ser conveniente además proporcionar un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un antagonista de citocinas, un antagonista de la integrina, o agente inmunosupresor (por ejemplo, uno que actúe sobre las células T, tales como ciclosporina o un anticuerpo que se une a las células T, por ejemplo, uno que se une a LFA-I). El tipo y la cantidad efectiva de este segundo medicamento dependen, por ejemplo, de la cantidad de anticuerpo

presente en la formulación, el tipo de trastorno o enfermedad o el tratamiento, los parámetros clínicos de los sujetos, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en la misma dosis y con vías de administración tal como se describe en la presente especificación o de alrededor de 1 a 99% de la
5 dosis empleada hasta ahora. El preferido de tales medicamentos se ha señalado anteriormente.

Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de reunión de partículas o por polimerización en la interfaz, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o
10 de gelatina o de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales para la distribución de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas, y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se divulgan, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical sciences 16 th edition, Osol, A. Ed. (1980)*.

15 Las preparaciones de liberación sostenida pueden ser preparadas. Los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros sólidos hidrofóbico que contienen el anticuerpo, donde dichas matrices son en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliéster, hidrogeles
20 (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli (alcohol vinílico)), polilactides (US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico- ácido glicólico degradables como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas del copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y poli-D-(-)-
25 3-ácido hidroxibutírico.

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* tienen que estar estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Usos

30 Un anticuerpo para la presente invención puede utilizarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. Los anticuerpos de la invención

pueden ser utilizados como antagonistas para bloquear parcial o totalmente la actividad específica de LTα *in vitro*, *ex vivo*, y/o *in vivo*. Por otra parte, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad de antígenos de otras especies. En consecuencia, los anticuerpos de la invención

5 pueden ser utilizados para inhibir la actividad de un antígeno específico, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en humanos, o en otros mamíferos que tienen el antígeno con el que el anticuerpo para la invención tiene reacción cruzada (por ejemplo, chimpancés, babuinos, tití, cinomolgus, macaco de la India, cerdo, o el ratón). En una forma de realización, el anticuerpo para la

10 invención puede ser utilizado para inhibir la actividad del antígeno mediante el contacto entre el anticuerpo y el antígeno de tal forma que se inhibe la actividad del antígeno. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

En una forma de realización, un anticuerpo para la invención puede ser utilizado en un método para la inhibición de un antígeno en un sujeto que padece un

15 trastorno en el cual la actividad del antígeno es perjudicial, que comprende la administración del anticuerpo para la invención de manera que se inhibe la actividad del antígeno en dicho sujeto. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana y el sujeto es un humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno al que se une el anticuerpo

20 para la invención. Aún más, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, por la administración del antígeno o por la expresión de un antígeno transgénico). Un anticuerpo para la invención se puede administrar a un sujeto humano con fines terapéuticos. Por otra parte, un anticuerpo para la invención puede ser administrado a un mamífero no humano

25 que expresa un antígeno con el que la inmunoglobulina tiene reacción cruzada (por ejemplo, uno de primates, cerdo, o ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. En cuanto a este último, por ejemplo, los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, el ensayo de dosis y el curso temporal

30 de administración). Los anticuerpos de la invención pueden ser utilizados para tratar, inhibir, retardar la progresión de, prevenir o retrasar la recurrencia de, mejorar, o prevenir las enfermedades autoinmunes, trastornos, o condiciones, tal como se define en la presente especificación .

En un aspecto, un anticuerpo bloqueador de la invención es específico para el antígeno ligando, e inhibe la actividad del antígeno mediante el bloqueo o interferencia de la interacción ligando-receptor que involucra al antígeno ligando, por consiguiente inhibiendo la señal de la ruta y otros eventos moleculares o celulares. La invención también cuenta con anticuerpos que son específicos contra el receptor y que no necesariamente evitan la unión con el ligando pero interfieren con la activación del receptor, por consiguiente inhiben cualquier respuesta que normalmente se inicia por la unión del ligando. La invención también incluye anticuerpos que ya sea de preferencia o exclusivamente se unen al complejo ligando-receptor. Un anticuerpo para la invención también puede actuar como un agonista de un receptor antigénico particular, y de este modo potenciando, incrementando o activando ya sean todas o algunas de las actividades de la activación del receptor mediada por el ligando.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo desnudo o, alternativamente, se conjuga con otra molécula, como un agente citotóxico. El anticuerpo se administra preferiblemente por vía subcutánea o intravenosa, mas preferiblemente por vía subcutánea.

En una forma de realización, el sujeto nunca ha sido tratado previamente con fármaco (s), tales como agente(s) inmunosupresor(s), para tratar el trastorno, y en una forma de realización particular no ha sido tratado previamente con un antagonista del TNF. En una forma de realización alternativa, el sujeto ha sido tratado previamente con fármaco(s) para el tratamiento de la enfermedad, incluso con un antagonista del TNF.

En un aspecto adicional, el paciente tiene una recaída de la enfermedad. En una forma de realización alternativa, el paciente no ha tenido recaída de la enfermedad.

En otro aspecto, el anticuerpo para la presente especificación es el único medicamento que se administra a los sujetos para tratar el trastorno. En un aspecto alternativo, el anticuerpo para la presente especificación es uno de los medicamentos utilizados para tratar el trastorno.

En un aspecto adicional, el único trastorno autoinmune que tiene el sujeto es RA. Alternativamente, el único trastorno autoinmune que tiene el sujeto es MS. Aun

más, alternativamente, el único trastorno autoinmune que tiene el sujeto es lupus, vasculitis asociada a ANCA, o el síndrome de Sjogren. En todos los casos el trastorno autoinmune se define más arriba. Aún más, en una forma de realización adicional, el sujeto tiene un nivel anormal de una o más citocinas reguladoras,

5 anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-factor reumatoide (FR), creatinina, nitrógeno ureico en sangre, anticuerpos anti-endoteliales, anticuerpos anti-neutrófilos citoplásmico (ANCA), infiltrado de células CD20, anticuerpos anti-ADN de doble cadena (dsDNA), anticuerpos anti-Sm, anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares, anticuerpos anti-fosfolípidos, anticuerpos anti-

10 ribosomales P, anticuerpos anti-Ro/SS-A, anticuerpos anti-Ro, anti-La anticuerpos, anticuerpos dirigidos contra los antígenos A o B asociados a Sjögren's- (SS-A o SS-B), anticuerpos dirigidos contra proteínas B de Centrómero (CENP B) o la proteína C de Centrómero (CENP C), autoanticuerpos a ICA69, anticuerpos contra el antígeno-Smith (Sm), anticuerpos anti-ribonucleoproteínas

15 nucleares, anticuerpos anti-ribosomales P, autoanticuerpos que tiñen la zona nuclear o perinuclear de neutrófilos (pANCA), anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos que tienen reacción cruzada con los gangliósidos Gm1 o GQ1b, anti-receptor de la acetilcolina (AChR), subtipo anti-AChR, o anticuerpos anti-tirosina cinasa específica de músculo (MuSK), anticuerpos anti-células

20 endoteliales de suero, IgG o anticuerpos anti-desmoglein (Dsg), anti-Centrómero, anti-topoisomerasa-1 (Scl-70), anticuerpos anti-RNA polimerasa o anti-U3-ribonucleoproteína (U3-RNP), anticuerpos anti-membrana basal glomerular (GBM), anticuerpos anti-membrana basal glomerular (GBM), anticuerpos anti - mitocondrial (AMA) o anti-mitocondriales M2, anti-peroxidasa tiroidea (TPO),

25 anticuerpos anti-tiroglobina (TG) o anti-receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), anti-nucleicos (AN), anti-actina (AA) o anticuerpos anti- antígenos de músculo liso (ASM), IgA anti-endomisial, IgA anti-transglutaminasa tisular, anticuerpos anti-gliadina IgA o IgG, anti-CYP21A2, anticuerpos anti-CYP11A1 o anti-CYP17, anti-ribonucleoproteína (RNP), o anticuerpos específicos para

30 miositis, anticuerpos anti-glicoproteína asociada a la mielina (MAG), anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (VHC), anti-gangliósidos GM1, anti-sulfato-3-glicuronil paraglobósido (SGPG), o anticuerpos IgM anti-glicoconjugado, anticuerpos IgM anti-gangliósidos, anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anti tiroglobina

(TG) o anticuerpos anti-receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR), anti-proteína básica de mielina o anticuerpos contra la glicoproteína oligodendrocítica de mielina, anticuerpos IgM factor reumatoide dirigidos contra la porción Fc de la IgG, anticuerpos anti-Factor VIII, o una combinación de éstos.

- 5 Los parámetros para evaluar la eficacia o el éxito del tratamiento de un trastorno autoinmune (que incluye una enfermedad relacionada con la autoinmunidad) serán conocidos por el médico experto en la enfermedad. En general, el médico experto buscara la reducción de los signos y síntomas de la enfermedad específica. Los siguientes son a modo de ejemplos.
- 10 En una forma de realización, los métodos y las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de la RA (siglas en Ingles). La RA se caracteriza por la inflamación de múltiples articulaciones, la pérdida del cartílago y la erosión ósea que conduce a la destrucción de las articulaciones y, en última instancia redujo la función articular. Además, dado que la RA es una enfermedad sistémica, puede
- 15 tener efectos sobre otros tejidos como los pulmones, los ojos, y la médula ósea.

Si el sujeto tiene la RA, que es una indicación preferida en la presente especificación, los anticuerpos de preferencia en la presente especificación inducen una respuesta clínica importante en el sujeto.

- Los anticuerpos de la presente especificación pueden ser usados como terapia
- 20 de primera línea en pacientes con RA temprana (es decir, el metotrexato (MTX) sencillo), o en combinación con, por ejemplo, MTX o ciclofosfamida. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser utilizados en el tratamiento de segunda línea de terapia para los pacientes que fueron, por ejemplo, refractarios a DMARD y/o inhibidor de TNF, y/o MTX, en combinación con, por ejemplo, MTX.
- 25 Los anticuerpos de unión a LT α también pueden ser administrados en combinación con agentes movilizadores de las células B, tales como los anticuerpos integrina que movilizan las células B en el torrente sanguíneo para aumentar la eficacia de la muerte. Los anticuerpos de unión LT α son útiles para prevenir y controlar el daño articular, retrasar daños estructurales, disminuir el
- 30 dolor asociado con la inflamación en la RA, y, en general, reducir los signos y síntomas en la RA de moderada a grave. Los pacientes con RA pueden ser tratados con el anticuerpo LT α antes, después o junto con el tratamiento con otros

- fármacos utilizados en el tratamiento de la RA (véase la terapia de combinación descrita en la presente especificación). En los pacientes en los que había fracasado anteriormente la DMARDs y/o tenían una respuesta inadecuada a MTX solo, en una forma de realización, son tratados con un anticuerpo de unión a LT α .
- 5 En otra forma de realización, a estos pacientes se les administra el anticuerpo humanizado de unión a LT α más ciclofosfamida o anticuerpos de unión de LT α más MTX. Más preferiblemente, los anticuerpos de la presente especificación se administran con MTX para el tratamiento de la RA, y no con altas dosis de esteroides.
- 10 Uno de los métodos de evaluación de la eficacia del tratamiento en la RA se basa en los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) los cuales son usados para medir el porcentaje de mejoría en las articulaciones dolorosas e inflamadas, entre otras cosas. El paciente de RA puede recibir la puntuación, por ejemplo, ACR 20 (20 por ciento de mejoría) en comparación con un tratamiento sin
- 15 ningún anticuerpo (por ejemplo, la referencia antes del tratamiento) o tratamiento con placebo. Otras formas de evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpos incluye puntuación de rayos X, tales como la puntuación "Sharp" de rayos X utilizadas para dar puntuación a los daños estructurales tales como la erosión ósea y la reducción del espacio articular. Los pacientes también pueden ser
- 20 evaluados para la prevención o la mejora de la discapacidad basándose en la puntuación del Cuestionario de Evaluación de la Salud (HAQ), la puntuación de AIMS, o SF-36 en períodos de tiempo durante o después del tratamiento. El criterio ACR 20 puede incluir el 20% de mejoría en las articulaciones contadas, tanto las sensibles (dolorosas) como las articulaciones inflamadas además de una
- 25 mejora del 20% en al menos tres de las cinco medidas adicionales:
1. evaluación del dolor del paciente por escala analógica visual (VAS, siglas en ingles),
 2. evaluación global del paciente de la actividad de la enfermedad (VAS),
 3. evaluación global del médico de la actividad de la enfermedad (VAS),
 - 30 4. autoevaluación de la discapacidad del paciente medida por el Cuestionario de Evaluación de la Salud, y

5. reactivos de fase aguda, la CRP o ESR.

Los ACR 50 y 70 se definen de manera similar. Preferiblemente, al paciente se le administra una cantidad de uno de los anticuerpos de la invención que se unen a LTα efectiva para lograr al menos una puntuación de ACR 20, preferiblemente al menos ACR 30, más preferiblemente al menos ACR 50, aún más preferiblemente al menos ACR 70, y más preferentemente, al menos, ACR 75.

La Artritis psoriática tiene características radiográficas únicas y diferentes. Para la artritis psoriática, la erosión de la articulación y el estrechamiento del espacio articular pueden ser igualmente evaluados por la puntuación de Sharp. Los anticuerpos divulgados en la presente especificación pueden usarse para prevenir el daño articular así como reducir las enfermedades signos y síntomas del trastorno. Sin embargo, otro aspecto de la invención es un método para tratar el lupus, incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE) y la nefritis lúpica, mediante la administración al sujeto que tenga dicha enfermedad una cantidad efectiva de un anticuerpo para la invención. Por ejemplo, la puntuación SLEDAI proporciona una cuantificación numérica de la enfermedad. El SLEDAI es un índice ponderado de 24 parámetros clínicos y de laboratorio que se sabe que se correlacionan con la actividad de la enfermedad, con una serie numérica de 0-103. Ver Gescuk y Davis, en *Current Opinion in Rheumatology*, 14: 515-521 (2002). Se cree que la causa de la exacerbadón renal y otras manifestaciones de lupus son los anticuerpos anti doble cadena de ADN. La insuficiencia renal de los pacientes sometidos a tratamiento con anticuerpos puede ser controlada durante un tiempo, que se define como, un aumento importante y reproducible en la creatinina sérica, las proteínas en la orina o la sangre en la orina. Como alternativa o como complemento, en los pacientes pueden ser controlados los niveles de anticuerpos antinucleares y anticuerpos para la doble cadena de ADN. Los tratamientos para el SLE incluyen altas dosis de corticosteroides y/o ciclofosfamida (HDCC).

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos de las articulaciones, incluida la espondilitis anquilosante, la artritis psoriática y la enfermedad de Crohn. El éxito del tratamiento se puede determinar mediante la validación del paciente y la evaluación del médico de las herramientas de medición global.

Varios medicamentos se usan para tratar la psoriasis, el tratamiento varía directamente en relación con la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con una forma más leve de la psoriasis suelen utilizar tratamientos tópicos, tales como esteroides tópicos, antralin, calcipotrieno, clobetasol y tazaroteno, para el manejo
5 de la enfermedad, mientras que los pacientes con la psoriasis moderada y grave es más probable que se use el empleo de terapias sistémicas (metotrexato, retinoides, ciclosporina, PUVA y UVB). Los alquitranes también se utilizan. Estos tratamientos son desfavorables debido a problemas de seguridad, los regímenes que consumen tiempo, y/o inconvenientes de los procesos de tratamiento.
10 Además, algunos sistemas requieren equipos costosos y un espacio dedicado en la oficina. Tales medicaciones sistémicas puede producir efectos secundarios graves, incluyendo la hipertensión, la hiperlipidemia, la supresión de médula ósea, una enfermedad hepática, una enfermedad renal, y molestias gastrointestinales. Además, el uso de la fototerapia puede aumentar la incidencia de cánceres de
15 piel. Además de las molestias y el malestar asociado con el uso de las terapias tópicas, la fototerapia y los tratamientos sistémicos tales pacientes requieren también ciclos de exposición a la terapia y ciclos de seguimiento debido a sus efectos secundarios.

La eficacia del tratamiento para la psoriasis es evaluada por el seguimiento de los
20 cambios en los signos y síntomas clínicos de la enfermedad, incluidos los cambios en la evaluación global del médico (PGA), resultados en el Índice de Severidad y Área de Psoriasis (PASI, siglas en ingles), y evaluación de los síntomas Psoriasis (PSA, siglas en ingles), en comparación con el estado básico. El paciente puede ser medido periódicamente durante el tratamiento en la Escala
25 Analógica Visual (VAS) que sirve para indicar el grado de picor experimentado en los puntos de tiempo específicos.

Ensayos

Los estudios de la unión ligando/receptor podrán realizarse en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de competencia de unión, ensayos tipo
30 sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Los ensayos basados en células y modelos animales se pueden utilizar para comprender la interacción entre los ligandos y los receptores identificados en la presente

especificación y el desarrollo y patogénesis de las enfermedades y las condiciones a que se refiere en el presente documento. En un enfoque, las células de mamíferos pueden ser transfectadas con los ligandos o receptores descritos en la presente especificación, y se analiza la capacidad de los anticuerpos descritos en la presente especificación para inhibir la unión o la actividad. Las células apropiadas pueden ser transfectadas con el gen deseado, y seguidas para detección de la actividad.

Tales líneas de células transfectada se pueden utilizar para poner a prueba la capacidad de los anticuerpos, por ejemplo, para modular la expresión de las células del complejo $LT\alpha\beta$.

Además, los cultivos primarios derivados de animales transgénicos pueden ser utilizados para los ensayos basados en células. Las técnicas para obtener líneas celulares de animales transgénicos son bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Small et al., Mol. Cell. Biol., 5:642-648 (1985).

Un ensayo apropiado basado en células es la adición del ligando con epítipo etiquetado (por ejemplo, $LT\alpha$) a las células que tienen o expresan los respectivos receptores, y el análisis de la unión (en presencia o ausencia de los posibles anticuerpos) por el sistema de tinción por FACS usando anticuerpos anti-etiqueta. En otro ensayo se analiza, la capacidad del anticuerpo para la presente especificación para inhibir la expresión del complejo $LT\alpha\beta$ en las células que expresan tales complejos. Por ejemplo, las líneas de células con adecuada expresión son cultivadas en presencia o ausencia de los posibles anticuerpos y la modulación de la expresión del complejo $LT\alpha\beta$ puede ser medida por la incorporación de timidina- H^3 o el número de células.

Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células pueden ser además verificados usando modelos animales *in vivo*. Muchos de los modelos animales pueden ser utilizados para probar la eficacia de los anticuerpos identificados en la presente especificación en relación con, por ejemplo, las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico. La naturaleza *in vivo* de estos modelos los hace particularmente predictivos de la respuesta en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico incluyen tanto los animales recombinantes (transgénicos) como los no

recombinantes. Los modelos de animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, los roedores, por ejemplo, los modelos murinos. Estos modelos pueden ser generados por la introducción de células en ratones singenicos utilizando técnicas estándar, como por ejemplo inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación en el bazo, implantación intraperitoneal, y la implantación bajo la cápsula renal.

La enfermedad injerto contra huésped es un ejemplo de enfermedad para la cual se ha diseñado un modelo animal. La enfermedad injerto contra huésped se produce cuando las células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células del donante reconocen y responden a los antígenos del hospedero. La respuesta puede variar desde una inflamación grave con una amenaza para la vida hasta los casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad injerto contra huésped proporcionan un medio de evaluar la reactividad de células T contra antígenos del MHC y los antígenos de trasplante menor. Un adecuado procedimiento se describe en detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. Cologan et al., (John Wiley & Sons, Inc., 1994), la unidad 4.3.

Un modelo animal para rechazo del aloinjerto de piel examina la capacidad de las células T para mediar *in vivo* la destrucción de los tejidos para medir su papel en la inmunidad anti-viral, y se describe, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, supra, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplante de utilidad para poner a prueba los anticuerpos de la presente especificación incluyen los modelos de trasplante alogénico de corazón descritos por Tanabe et al, *Transplantation*, 58:23 (1994) y Tinubu et al, *J. Immunol.*, 4330-4338 (1994).

Los modelos animales para de hipersensibilidad retardada proporcionan un ensayo de función inmunológica mediada por las células. Las reacciones de hipersensibilidad retardada son una respuesta inmune *in vivo* mediada por células T y caracterizada por la inflamación que no llega a un pico hasta después de un período de tiempo transcurrido después del desafío con el antígeno. Estas reacciones también se producen en enfermedades autoinmunes específicas de tejidos como la esclerosis múltiple y la encefalomiелitis experimental autoinmune

(EAE, un modelo de MS). Un ejemplo de modelo adecuado, se describe en detalle en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, la unidad 4.5.

El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) es considerado un modelo adecuado para el estudio de posibles fármacos o biológicos activos en la artritis

5 en humanos debido a las numerosas similitudes inmunológicas y patológicas a la RA humana, la participación de la activación de los linfocitos T auxiliares restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, y la similitud de las lesiones histológicas. Las características de este modelo de CIA que son similares a la encontrada en los pacientes con RA incluyen: la erosión del

10 cartílago y hueso en los márgenes de la articulación (como puede verse en las radiografías), sinovitis proliferativa, y la participación simétrica de las pequeñas y medianas articulaciones periféricas en el esqueleto apendicular pero no en el axial, *Jamieson et al, Invest. Radiol* 20: 324-9 (1985). Por otra parte, la IL-1 y TNF- α parecen estar involucrados en la CIA así como en la RA. *Joosten et al, J. Immunol.* 163: 5049-5055 (1999). Los anticuerpos neutralizantes anti-TNF, y por separado, TNFR.Fc, provocaron la reducción de los síntomas de la RA en este

15 modelo (*Williams et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9784-9788 (1992); *Wooley et al, J. Immunol.*, 151: 6602 - 6607 (1993)).

En este modelo para la RA, el colágeno tipo II es purificado del cartílago articular

20 de la especie bovina (*Miller, Biochemistry* 11: 4903 (1972)) y lo usa para inmunizar los ratones (*Williams et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91: 2762 (1994)). Los síntomas de la artritis incluyen eritema y/o hinchazón de las extremidades así como erosiones o defectos en el cartílago y huesos, según se ha determinado por histología. Este modelo ampliamente utilizado también fue descrito, por ejemplo,

25 *Holmdahl et al., APMIS*, 97:575 (1989), en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, units 15.5, y en *Issekutz et al., Immunology*, 88:569 (1996). Un modelo de asma se ha descrito en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígenos, la eosinofilia pulmonar y la inflamación son inducidas por la sensibilización de un animal con la ovoalbúmina y retando al animal con la misma

30 proteína emitida por aerosoles. Los modelos en animales tales como roedores y los modelos en primates no humanos, presentan síntomas similares al asma atópica en los seres humanos al desafío con antígenos en aerosoles. Los

procedimientos adecuados para probar si los anticuerpos de la presente especificación son idóneos para el tratamiento del asma incluyen los descritos por Wolyniec et al., *Am. J. Respir. Cell Mol Biol*, 18:777 (1998).

Además, los anticuerpos de la presente especificación pueden ser probados para trastornos inmunes en el modelo de ratón SCID/SCID. Por ejemplo, según lo descrito por Schon et al., *Nat. Med.*, 3: 183 (1997), los ratones manifestaron lesiones de la piel histopatológicamente parecidas a la psoriasis. Otro modelo adecuado es el ratón quimera con piel humana/SCID preparado como se describe por Nickoloff et al., *Am. J. Path.*, 146:580 (1995).

10 Dosificación

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo para la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con un segundo medicamento como se señala más adelante) dependerá, por ejemplo, del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpos, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la prudencia del médico de asistencia. La dosis efectiva es de preferencia para el tratamiento de esa indicación y reducir al mínimo la toxicidad y efectos secundarios.

El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en un momento o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, alrededor de 1 mg/kg a 500 mg/kg (preferentemente aproximadamente de 0.1 mg/kg a 400 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, por ejemplo, por uno o más administraciones separadas, o por perfusión continua. Una dosis diaria típica puede variar desde alrededor de 1 mg/kg a 500 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre la deseada supresión de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de la dosis de anticuerpo estará en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg o 50 mg/kg o 100 mg/kg o 300 mg/kg

o 400 mg/kg (o cualquier combinación de estas) puede ser administrada al paciente. Esas dosis se pueden administrar a intervalos, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe de dos hasta aproximadamente veinte, por ejemplo, alrededor de seis dosis de anticuerpo). Una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas, se puede administrar. Un ejemplo de dosificación inicial comprende la administración de una dosis de carga de alrededor de 4 a 500 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de alrededor de 2 a 400 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia es fácilmente controlado por ensayos y técnicas convencionales y.

Para el tratamiento de un trastorno autoinmune, la dosis terapéuticamente efectiva suele estar en el rango de aproximadamente 50 mg/m² a 3000 mg/m², de preferencia aproximadamente entre 50 y 1500 mg/m², más preferible sobre 50-1000 mg/m². En una forma de realización, el rango de dosis es de aproximadamente 125-700 mg/m². Para el tratamiento de la RA, en una forma de realización, el rango de dosis del anticuerpo humanizado es de unos 50 mg/m² o 125 mg/m² (equivalente a alrededor de 200 mg/dosis) a alrededor de 1000 mg/m², dados en dos dosis, por ejemplo, la primera dosis de 200 mg se administra en el primer día seguida de una segunda dosis de 200 mg el día 15. En diferentes formas de realizaciones, la dosis es de aproximadamente 50 mg/dosis, 80 mg/dosis, 100 mg/dosis, 125 mg/dosis, 150 mg/dosis, 200 mg/dosis, 250 mg/dosis, 275 mg/dosis, 300 mg/dosis, 325 mg/dosis, 350 mg/dosis, 375 mg/dosis, 400 mg/dosis, 425 mg/dosis, 450 mg/dosis, 475 mg/dosis, 500 mg/dosis, 525 mg/dosis, 550 mg/dosis, 575 mg/dosis o 600 mg/dosis o 700 mg/dosis o 800 mg/dosis o 900 mg/dosis, o 1000 mg/dosis, o 1500 mg/dosis.

En el tratamiento de la enfermedad, los anticuerpos de la invención que se unen a LTα se pueden administrar al paciente de manera crónica o intermitente, según lo determine el médico experto en la enfermedad.

Un paciente al que se le administre un fármaco por perfusión intravenosa o subcutánea puede experimentar reacciones adversas tales como fiebre, escalofríos, sensación de quemazón, astenia, y dolor de cabeza. Para mitigar o minimizar tales efectos adversos, el paciente puede recibir una(s) dosis

condicional inicial del anticuerpo seguida de una dosis terapéutica. La(s) dosis condicional será inferior a la dosis terapéutica para poner al paciente en condición para tolerar dosis más altas.

Los anticuerpos de la presente especificación se pueden administrar con una
5 frecuencia que está dentro de la competencia y el juicio del médico practicante, dependiendo de diversos factores señalados anteriormente, por ejemplo, la cantidad de dosificación. Esta frecuencia incluye dos veces por semana, tres veces por semana, una vez a la semana, cada dos semanas o una vez al mes, en un aspecto preferido de este método, el anticuerpo se administra no más de
10 aproximadamente una vez cada dos semanas, preferiblemente una vez al mes.

Vías de administración

Los anticuerpos utilizados en los métodos de la invención (asi como segundos medicamentos) se administran a un sujeto o un paciente, incluyendo un paciente humano, de acuerdo con métodos adecuados, tales como los conocidos por los
15 médicos, en función de muchos factores, entre ellos, si la dosis es aguda o crónica. Estas rutas incluyen, por ejemplo, parenteral, administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o en infusión continua durante un período de tiempo, por vía subcutánea, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, intrapulmonar, intracerebrospinal, intra-articular, intrasinovial, intratecal, intralesional, inhalación o
20 vías (por ejemplo, por vía intranasal). Las infusiones parenterales incluyen intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, o la administración subcutánea. Además, el anticuerpo es convenientemente administrado por perfusión por pulsos, en particular con la disminución de la dosis de anticuerpos. Las rutas preferidas en la presente especificación son la administración
25 subcutánea o intravenosa, más preferiblemente subcutánea.

En una realización, el anticuerpo para la presente especificación se administra como perfusión intravenosa, y más preferiblemente con aproximadamente 0,9 a 20% de solución de cloruro de sodio como vehículo de infusión.

Terapia de combinación

30 En cualquiera de los métodos de la presente especificación, se puede administrar al sujeto o al paciente junto con el anticuerpo para la presente especificación una

cantidad efectiva de un segundo medicamento (en el que el anticuerpo de presente especificación es un primer medicamento), que es otro agente activo que pueda tratar la condición en el sujeto que requiere de tratamiento, por ejemplo, si la condición es un trastorno autoinmune, el segundo medicamento es

5 un medicamento que puede tratar el trastorno autoinmune, solo o con otro agente activo. Para el tratamiento de trastornos autoinmunes, el segundo medicamento incluye, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente inmunosupresor, un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a un marcador de superficie de las células B como el rituximab o el humanizado 2H7, un antagonista del

10 BAFF, un DMARD, un agente citotóxico, un antagonista de la integrina, tal como un antagonista CD11 o CD18 incluyendo anticuerpos CD11 o CD18, por ejemplo, efalizumab (RAPTIVA ®), un NSAID, un antagonista de citocinas, como un antagonista del TNF, un agente anti-reumático, un relajante muscular, un narcótico, un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un

15 bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteriod, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, un agente inmunizante, una inmunoglobulina, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide para inhalación, la epinefrina, una citocina, células para reprimir la secreción de

20 autoanticuerpos de las células B como se establece en WO 2005/027841, una glicoproteína hialuronidasa tal como un vehículo de reparto activo que figura en, por ejemplo, WO 2004/078140, o una combinación de éstos.

Para el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer, el segundo medicamento incluirá, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos,

25 hormonas, agentes citotóxicos, y otros biológicos, como los anticuerpos contra HER-2, contra VEGF, contra antígenos de superficie de las células B como el antígeno TAHO (por ejemplo, US 2006/0251662), CD20 y CD22, y contra EGF/EGF-R.

Preferiblemente, este segundo medicamento para las enfermedades autoinmunes

30 es un agente inmunosupresor, un antagonista que se une a un marcador superficie de las células B (por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos CD20 o CD22), un antagonista del BAFF, un DMARD, un antagonista de la

integrina, una glicoproteína hialuronidasa (como un vehículo de entrega activa), un NSAID, un antagonista de citocinas, más preferiblemente un TNF (por ejemplo, TNF-alfa), antagonista CD11 o CD18, o una combinación de éstos. Más preferentemente, es el metotrexato, un antagonista del TNF, un antagonista de un
5 marcador superficie de las células B, o un DMARD.

El tipo de este segundo medicamento depende de varios factores, incluido el tipo de trastorno autoinmune, la gravedad de la enfermedad, la condición y la edad del paciente, el tipo y la dosis del primer medicamento empleado, etc

Los anticuerpos de la presente especificación pueden ser administrados
10 simultáneamente, secuencialmente, o alternando con el segundo medicamento o a falta de respuesta con la otra terapia. Así, la administración combinada de un segundo medicamento que incluye la co-administración (administración simultánea), utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde de
15 preferencia hay un período de tiempo, mientras que ambos (o todos) los medicamentos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Todos estos segundos medicamentos se pueden utilizar en combinación unos con otros o cada uno por sí mismo con el primer medicamento, de manera que la expresión "segundo medicamento", tal como se utiliza en la presente especificación no
20 significa que sea el único medicamento que se usa además del primer medicamento, respectivamente. Por lo tanto, el segundo medicamento no tiene que ser un medicamento, pero puede estar constituido o comprender más de una de tales fármacos.

Estos segundos medicamentos como se establece en la presente especificación
25 se utilizan generalmente en la misma dosis y con las mismas vías de administración de los primeros medicamentos, o desde aproximadamente 1 a 99% de la dosis de los primeros medicamentos. Si estos segundos medicamentos se utilizan, de preferencia, se utilizan en cantidades menores que si el primer medicamento no estuviese presente, sobre todo en las dosis posteriores a la
30 dosis inicial con el primer medicamento, con el fin de eliminar o reducir los efectos secundarios causados por el mismo.

Para el tratamiento de la RA, por ejemplo, el paciente puede ser tratado con un anticuerpo para la invención junto con uno o más de los siguientes medicamentos: los antagonistas de la integrina, DMARDs (por ejemplo, MTX), NSAIDs, inhibidores de citocinas, como HUMIRA TM (adalimumab; Abbott Laboratories),

5 ARAVA [®] (leflunomida), REMICADE [®] (infliximab; Centocor Inc., de Malvern, Pa), ENBREL [®] (etanercept; Immunex, WA), corticosteroides, o los inhibidores de la COX-2. DMARDs comúnmente utilizados en la RA incluyen hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab, azatioprina, D-penicilamina, Oro (oral), Oro (intramuscular), la minociclina, la ciclosporina, o

10 inmunoadsorción a proteína A de *Staphylococcal*. El Adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une a TNF α . El Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a TNF α . El Etanercept es una proteína de fusión "inmunoadhesina" que consiste de la porción extracelular de 75 kD (p75) de unión al ligando del receptor del factor de necrosis tumoral humano del

15 receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) unido a la porción Fc de una IgG1 humana. Para el tratamiento convencional de la RA, véase, por ejemplo, el American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, *Arthritis & Rheumatism* 46 (2): 328-346 (2002). En una forma de realización específica, el paciente de RA es tratado con un anticuerpo LT α de la

20 invención en combinación con MTX. Un ejemplo la dosis de MTX es aproximadamente 7.5-25 mg/kg/semana. El MTX puede administrarse por vía oral y subcutánea.

Para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, artritis psoriática y enfermedad de Crohn, el paciente puede ser tratado con un anticuerpo para la invención en

25 junto con, por ejemplo, REMICADE [®] (infliximab; de Centocor, Inc., Malvern, PA) o ENBREL [®] (etanercept, Amgen, CA).

Los tratamientos para el SLE incluyen altas dosis de corticosteroides y/o ciclofosfamida (HDCC) junto con los anticuerpos de la presente especificación.

Para el tratamiento de la psoriasis, a los pacientes se le puede administrar un

30 anticuerpo que se une a LT α junto con tratamientos tópicos, tales como esteroides tópicos, antralin, calcipotriene, clobetasol y tazaroteno, o con MTX, retinoides, ciclosporina, terapias PUVA y UVB, y antagonistas de la integrina como los

anticuerpos anti-CD11 o anti-CD18, incluyendo, por ejemplo, efalizumab (RAPTIVA®). En una forma de realización, el paciente con psoriasis es tratado con el anticuerpo de unión a LT α secuencial o simultáneamente con ciclosporina o con efalizumab.

- 5 En determinadas formas de realización, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo para la presente especificación conjugado con un agente citotóxico. En algunas formas de realización el inmunoconjugado y/o el antígeno al cual este se une, es/son internalizados por la célula, resultando en una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la
- 10 muerte de las células a las que se une. En una realización, el agente citotóxico elige como blanco o interfiere con los ácidos nucleicos de la célula diana. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos señalados en la presente especificación (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo, una ribonucleasa, o
- 15 una endonucleasa de ADN.

Artículos de fabricación

- En otra realización de la invención, se proporcionan artículos de fabricación que contienen materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos más arriba. En un aspecto, el artículo de fabricación comprende (a) un contenedor que
- 20 comprende los anticuerpos de la presente especificación (de preferencia el contenedor comprende el anticuerpo y un transportador farmacéuticamente aceptable o un diluyente dentro del contenedor), y (b) un prospecto con las instrucciones para el tratamiento de la enfermedad en un paciente.

- En una realización preferida, este artículo de fabricación de la presente
- 25 especificación comprende además un recipiente que comprende un segundo medicamento, en el que el anticuerpo es el primer medicamento. Este artículo comprende además instrucciones en el prospecto para el tratamiento del paciente con el segundo medicamento, en una cantidad efectiva. El segundo medicamento puede ser cualquiera de los enunciados más arriba, un ejemplo de un segundo
- 30 medicamento será un antagonista que se une a un marcador de superficie de las células B (por ejemplo, un anticuerpo para CD20), un antagonista del BAFF, un agente inmunosupresor, incluyendo MTX y corticosteroides, un antagonista de la

integrina, un antagonista de la citocina tal como un antagonista TNF, antagonistas CD11 o CD18, o una combinación de éstos. Los ssegunbdos medicamentos preferidos son un esteroide, un antagonista de citocinas, y/o un agente inmunosupresor.

- 5 En este aspecto, el prospecto está en el contenedor o asociado al mismo. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc Los contenedores pueden formarse de una variedad de materiales como el vidrio o plástico. El contenedor tiene o contiene una composición que es efectiva para el tratamiento de la enfermedad en cuestión y puede tener un puerto de acceso
- 10 estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa para solución intravenosa o un frasco con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el anticuerpo para la presente especificación . La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza para el tratamiento de un trasyltorno en particular en un paciente en un paciente o
- 15 sujeto elegible para el tratamiento con una orientación específica en relación con la administración de las composiciones a los pacientes, incluyendo las cantidades y los intervalos de dosificación de los anticuerpos y de cualquier otro medicamento que se proporcione. El prospecto se refiere habitualmente a las instrucciones incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos
- 20 que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, y/o advertencias relativas a la utilización de dichos productos terapéuticos. El artículo de fabricación puede además comprender un contenedor adicional compuesto por un diluyente farmacéuticamente aceptable de solucion tamponada, como el agua
- 25 bacteriostática para inyección (BWFI), solución tamponada de fosfato salina, solución de Ringer, y/o solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de los usuarios, incluidos los otros búferes, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En una realización de la invención, el artículo de fabricación comprende que se

- 30 proporcione junto con, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para la presente especificación y un transportador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta indicando que el anticuerpo o la composición

farmacéutica está indicada para el tratamiento de pacientes con una enfermedad autoinmune como la RA, MS, lupus, o la IBD (siglas en ingles).

En una forma de realización preferida el artículo de fabricación de lapresente especificación además dispone de un contenedor que comprende un segundo
5 medicamento, en el que el anticuerpo es el primer medicamento, y que el artículo además comprende instrucciones en el prospecto para el tratamiento del paciente con el segundo medicamento, en una cantidad efectiva. El segundo medicamento puede ser cualquiera de los enunciados más arriba, un ejemplo de segundo medicamento son los que acaban de exponerse, incluyendo, en particular para el
10 tratamiento de la RA, un agente inmunosupresor, un corticosteroide, un DMARD, un antagonista de la integrina, un NSAID, un antagonista de citocinas, un bifosfonato, o una combinación de los mismos, más preferiblemente un DMARD, NSAID, los antagonistas de citocinas, el antagonista de la integrina, o un agente inmunosupresor. Más preferentemente, el segundo medicamento es metotrexato
15 o un DMARD si la enfermedad es la RA.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para el envasado o la fabricación de un anticuerpo para la presente especificación o de una composición farmacéutica que comprende la combinación de los mismos en un paquete de anticuerpos o la composición farmacéutica y una etiqueta indicando
20 que el anticuerpo o composición farmacéutica está indicado para el tratamiento de pacientes con una enfermedad autoinmune como la RA, MS, lupus, o la IBD.

Métodos de Publicidad

La presente invención también incluye un método para la publicidad de un anticuerpo para la presente especificación o una composición farmacéuticamente
25 aceptable que comprende la promoción, a un público diana, de la utilización de anticuerpos o la composición farmacéutica del mismo para el tratamiento de un paciente o una población de pacientes con enfermedades autoinmunes como la RA, MS, lupus, o la IBD.

La publicidad es generalmente comunicación pagada a través de un medio no
30 personal en la que el patrocinador se identifica y el mensaje es controlado. La publicidad para los fines de la presente especificación incluye publicidad,

relaciones públicas, la colocación de productos, el patrocinio, la suscripción, y la promoción de ventas. Este término también incluye anuncios públicos de información patrocinados, que aparecen en cualquiera de los medios de comunicación impresos diseñados para atraer a una audiencia de masas, para
5 persuadir, informar, promover, motivar, o modificar el comportamiento hacia un patrón de compra favorable, de apoyo, o de aprobación de la presente invención.

La publicidad y la promoción de los métodos de tratamiento en la presente especificación pueden realizarse por cualquier medio. Los ejemplos de los soportes publicitarios utilizados para entregar estos mensajes incluyen la
10 televisión, la radio, películas, revistas, periódicos, Internet y vallas publicitarias, incluyendo anuncios, que son mensajes que aparecen en los medios de comunicación. También incluyen los anuncios en los asientos de los carritos de supermercado, en las paredes de un pasillo del aeropuerto, y en los laterales de los autobuses, o escuchado en los mensajes de teléfono o en los sistemas las
15 tiendas PA, o en cualquier lugar que se pueda colocar una comunicación visual o audible, generalmente en lugares públicos. Los ejemplos más concretos de promoción o publicidad, los medios incluyen televisión, radio, cine, Internet, tales como webcasts y seminarios web, redes interactivas para llegar a usuarios simultáneos, fijas o vallas electrónicas y otros signos, carteles, tradicionales o
20 electrónicos, tales como revistas de literatura y periódicos, otros medios de comunicación, presentaciones o por contactos individuales, por ejemplo, e-mail, teléfono, mensajería instantánea, correos, mensajería, masa, transportista o correo, en persona, visitas, etc

El tipo de publicidad utilizada dependerá de muchos factores, por ejemplo, sobre
25 la naturaleza de la audiencia que debe alcanzarse, por ejemplo, hospitales, compañías de seguros, clínicas, médicos, enfermeras y pacientes, así como las consideraciones de costo y de las leyes de competencia y los reglamentos que rigen la publicidad de los medicamentos. La publicidad puede ser individualizada o personalizada sobre la base de la caracterización de los usuarios definidos por
30 la interacción de servicios y/o en otros datos, tales como la demografía de usuario y la ubicación geográfica.

Los siguientes no son ejemplos de limitación de los métodos y las composiciones de la invención. Se entiende como que otras formas de realización diversas pueden ser realizaciones practicadas, teniendo en cuenta la descripción general antes mencionada. La divulgación de todas las citas en la especificación son expresamente incorporadas en la presente especificación a modo de referencia.

EJEMPLO 1: Preparación de los anticuerpos monoclonales anti-LT α murino y humano y las quimeras hámster-murino.

Los anticuerpos monoclonales anti-LT α humana, 2C8 y 3F12 se han generado de la siguiente manera: ratones BALB/c (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) fueron hiperimmunized por inyección de 5 mg/dosis de LT α humana recombinante expresada en *E. coli* y purificada (Genentech, Inc., South San Francisco, CA; Genentech Lote # 8360-2B, véase también Spriggs, "Tumor Necrosis Factor: Basic Principles and Preclinical Studies", *Biological Therapy of Cancer*, Devita al, eds., JB Lippincott Company (1991), Ch. . 16, págs. 354-377; Ruddle, *Current opinión in Immunology*, 4:327-332 (1992), Wong et al. "Tumor Necrosis Factor", *Human Monocytes*, Academic Press (1989), págs. 195-215; Aggarwal et al, *Cytokines and Lipocortins in Ifflamation and Differentiation*, Wiley-Liss, Inc., 1990, págs. 375-384, y Paul et al., *Ann. Rev. Immunol*, 6:407-438 (1988)) en Detox TM adyuvante (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MO). En concreto, 10 μ g LT α 3 se mezclaron con 50 μ L del adyuvante y se inyectó por vía subcutánea en la almohadilla plantal de la pata trasera de ratones (cepa BALB/c) en los días 1, 4, 15, 29, 41, 56 y 71. Se extrajeron muestras de suero en los días 15 y 56 para la detección por ELISA de unión de anticuerpos específicos anti-LT α 3.

El día 75, los animales se sascrificaron, se recopilaron los bazos, y 3 x 10⁷ células se fundieron con 5x10⁷ células de la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653 usando 50% de polietilenglicol (PEG) 4000 por un procedimiento establecido (Oi y Herzenberg , *Selected Methods in Cellular Immunology*, B. Mishel y S. Schiigi, eds., (WJFreeman Co., San Francisco, CA, 1980)). Las células fundidas se sembraron en placas de microtitulación de 96-pocillos con una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo que contiene medio HAT para la selección (Littlefield, *Ciencia*, 145:709 (1964)). Después de 12 días, los sobrenadantes fueron cosechados y seleccionados para la producción de anticuerpos por ELISA

directo. Los sobrenadantes cosechados de cada linaje de hibridoma se purificaron mediante cromatografía de afinidad (cromatografía líquida de proteínas rápida de Pharmacia (FPLC), Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las preparaciones de anticuerpos purificados se esterilizaron por filtración (0,2 µm de tamaño de poro; 5 Nalgene, Rochester, NY) y se almacenan a 4 ° C en solución tamponada de fosfato salino (PBS).

El anticuerpo monoclonal S5H3 contra LTα murino se generó de la siguiente manera: Se inmunizaron hámsters Armenios con LTα2β1 de ratón recombinante (R & D Systems Inc. (1008-LY)). Los hámsters fueron inmunizados con 2 µg del 10 antígeno en la almohadilla plantar de las patas traseras en 12 inyecciones, con un estímulo IP de 2 µg de antígeno de una vez. Los ganglios linfáticos y los bazo se fundieron mediante el tratamiento con PEG. El tamizaje primario se realizó por ELISA sobre LTα-6His murina fabricada por Inmunógeno-vs-Genentech (LTα murina con seis histidinas ligadas en el C-terminal). La detección se realizó con 15 con AFFINIPURE™ IgG de cabra anti-hámster armenio conjugada con peroxidasa (H + L) (Jackson ImmunoResearch 127-035-160). El tamizaje secundario fue realizada por FACS sobre las células HEK 293 transfectadas irrelevantes vs las células HEK 293 transfectadas establemente con LTαβ murino (bajo la selección de G418). La detección se realizó con AFFINIPURE™ F (ab') 2 20 de IgG de cabra anti-hámster armenio conjugada con R-ficoeritrina (H + L) (Jackson ImmunoResearch 127-116-160). El hibridoma a partir del cual se obtuvo este anticuerpo fue depositado en ATCC con número de Depósito PTA-7538 (hibridoma murino Linfotóxina alfa2 beta1 s5H3.2.2).

Todos los anticuerpos anti-LTα murina y humana generados en estos 25 experimentos se seleccionaron para el reconocimiento de LTα3. Estos fueron tamizados para (a) el bloqueo de la unión de LTα3 a TNFR1 y TNFR11 por ELISA, (b) la unión de LTαβ por ELISA y FACS de células transfectadas establemente con LTα y LTβ, y (c) el bloqueo de la interacción de LTαβ con el receptor LTβ por ELISA. Los anticuerpos 3F12, 2C8, y S5H3 fueron 30 seleccionados debido a que todos ellos se unieron y neutralizaron LTα3 y LTαβ.

El hibridoma de hámster anti-LTα murino fue clonado como una quimera hámster/ratón para su uso en los estudios murinos *in vivo* descritos a

continuación. El ARN total fue extraído de las células del hibridoma S5H3 utilizando un RNEASY MINI™ Kit (Qiagen) y el protocolo sugerido por el fabricante. La RT-PCR se realizó utilizando el kit Qiagen ONE-STEP™, y los primers fueron diseñados para amplificar los dominios variables de las cadenas ligera y pesada y añadir sitios de restricción enzimática para la clonación.

Para la construcción de la cadena ligera del anticuerpo quimérico S5H3, se utilizaron dos pasos secuenciales de clonación. En el primer paso, la RT-PCR, se añadieron los sitios ClaI and Ascl, usando el juego de cebadores uno, que permita la clonación en un vector basado en pRK simplemente para amplificar el ADN para la secuenciación. Después que se obtuvo la secuencia de ADN del dominio variable de la cadena ligera, se realizó una ronda de PCR utilizando este plásmido como molde, con el fin de añadir los sitios EcoRV y KpnI que son compatibles con el vector de expresión.

Para la construcción de la cadena pesada de S5H3, de igual modo se usaron dos pasos de clonación. En concreto, la RT-PCR fue utilizada para amplificar el cDNA y añadir los sitios ClaI y Ascl para la clonación en un vector de secuenciación. Posteriormente, este plásmido se utilizó como molde para añadir por PCR los sitios BsiWI y ApaI que son compatibles con el vector de expresión.

Para la RT-PCR, los cebadores utilizados fueron los siguientes:

- 20 S5H3 cadena ligera juego uno:
cebador 5': GGA TCA TCG ATA CAR CTN GTV YTN CAN CAR TCN CC (SEQ ID NO:56)
cebador 3': GGT AAC GGC GCG CCG YTC AGA AGA TGG TGG RAA (SEQ ID NO: 57)
- 25 S5H3 cadena ligera juego dos:
Cebador 5': GGA TCC GAT ATC CAG CTG GTA TTG ACC CAA TCT (SEQ ID NO: 58)
Cebador 3': GGA TCA GGT ACC GCT GCC AAA AAC ACA CGA CCC (SEQ ID NO:59)
- 30 S5H3 cadena pesada juego uno:

Cebador 5': TGA TAA TCG ATG ARG TNC CAT TTR GTN GAR (SEQ ID NO: 60)

Cebador 3': TAG TAA GGC GCG CCT GGT CAG GGA NCC NGA RTT CCA
(SEQ ID NO: 61)

S5H3 cadena pesada juego dos:

5 Cebador 5': TGA TCG CGT ACG CTG AGG TTC AAT TGG TTG AG (SEQ ID NO: 62)

Cebador 3': TGA TCG TGG GCC CTT TGT TGT GGC TGA GGA GAC GG (SEQ ID NO: 63) donde R = A o G, Y = C o T, y N = los cuatro ácidos nucleicos A, G, C y T. El dominio variable de la cadena ligera producto de la PCR fue purificado y
10 posteriorment e clonado en un vector de expresión de células de mamífero pRK (pRK.LPG2.mukappa) que contiene el dominio constante kappa murino. Para la cadena pesada, el producto de la PCR fue clonado en un vector de expresión de células de mamífero pRK (pRK.LPG10.mulgG2a) que codifica el dominio CH1 murino, la bisagra, y los dominios CH2 y CH3 del isotipo murino IgG2a. Estos
15 vectores son los derivados de los vectores descritos previamente para la expresión de IgGs en las células 293 (Shields et al, J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (2000) y Gorman et al, DNA Prot. Eng. Tech, 2:3-10 (1990)). Para la expresión del anticuerpo quimérico S5H3, los plásmidos de las cadenas ligeras y pesadas fueron co-transfectadas transitoriamente en las células 293 (una de
20 células embrionarias de riñón humano transformada con un adenovirus (Graham et al, J. Gen. Virol., 36:59-74 (1977)) o las células CHO. El anticuerpo proteico se purificó a partir de sobrenadante de cultivos celulares mediante la cromatografía de afinidad en proteína A.

El ELISA de unión de LTα3 se realizó de la siguiente manera: Los pocillos de
25 placas de microtitulacion fueron recubiertos con 1 mg/ml de LTα3 en 50 mM de solución tampón carbonato (50 µl/pocillo) durante la noche. La solución que no estaba adsorbida fue removida de los pocillos por aspiración. Los pocillos fueron bloqueados con 200 µL de PBS que contiene 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (PBS-BSA) durante 2 horas. A cada pocillo se anadieron 50 µL de la muestra
30 adecuadamente diluida en PBS-BSA, fue incubado durante una hora, y se lavó con PBS que contenia 0,05% del surfactante Tween-20 TM. En cada uno de los

pocillos se añadió 100 µL de IgG anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa de rábano picante en tampón PBS-BSA y se incubó durante una hora. Cada pocillo fue lavado con PBS/0.05% Tween-20 TM y, a continuación, los agentes surfactantes y se añadió a cada pocillo una solución tampón citrato fosfato, pH 5, que contiene 0,1 mg de o-phenylenediamine/ml (solución de sustrato), y el 30% H₂O₂ acuoso. Los pocillos se incubaron durante 30 minutos y, a continuación, la reacción se detuvo con 50 µL 2.5 M de ácido sulfúrico H₂SO₄, y la absorbancia fue leída a 490 nm.

El ELISA de bloqueo de LTα₃, el ELISA de unión de LTαβ y los ensayos de FACS, y el ELISA de bloqueo de LTαβ fueron llevados a cabo por procedimientos que se describen más adelante.

EJEMPLO 2: La secuencia, humanización y maduración de afinidad del anticuerpo anti-LTα, 3F12.

1. Secuenciación *de novo* del anti-LTα 3F12 utilizando el análisis LTQ-FTMS-MS/MS y la degradación de Edman.

Debido a que la línea celular de hibridoma 3F12.2D3 se perdió a partir de la línea celular de banco congelada, la proteína del anticuerpo monoclonal anti-LTα, purificado de ascitis 3F12.2D3, se sometió a la secuenciación en una concentración de alrededor de 3,0 mg/ml en PBS. El anticuerpo (Ac) se separó en SDS-PAGE al 4-20% en TRIS HCl TM en condiciones de reducción y cada una de las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) fueron sometidas a la secuencia N-terminal (se secuenciaron 25-30 residuos) para fundamentar la monoclonalidad. La HC se encontró bloqueada con un grupo piroglutamil que hizo inaccesible para la secuenciación de Edman el aminoácido N-terminal. El grupo bloqueado fue posteriormente suprimido mediante la enzima piroglutamato aminopeptidasa (PGAP) y la cadena HC sometido a la secuencia de nuevo. Se confirmó que tanto la HC como la LC son monoclonales. El Ac fue tratado con diversos productos químicos y enzimáticos para provocar hendiduras de acuerdo a una estrategia descrita en *Analytical Biochemistry*, 35:77-86 (2006). En resumen, consistió en las enzimas tripsina, endo Lys-C, Asp-N, y tratamientos químicos con CNBr y ácido diluido (escisión Asp/Pro).

La división química generó una mezcla de péptidos que se han secuenciado en el secuenciador modelo 494 Procise TM e identificados con el programa de Genentech SEQSORT (SEQSORT es un programa de utilidad diseñado para ordenar y hacer más manejables y legibles la salida de los programas de análisis de secuencias Pittsburgh Supercomputing Center). Estas divisiones químicas permitieron la identificación de la región constante de la LC y la HC mediante la identidad con los anticuerpos en las bases de datos de secuencias de proteínas. Los péptidos generados a partir de las digestiones enzimáticas se obtuvieron de las separaciones capilar por RP-HPLC y la masa del péptido medida por medio del análisis MALDI-TOF. Los péptidos cuyas masas que no coinciden con las regiones constantes fueron objeto de un análisis más detallado mediante la degradación de Edman o la cromatografía líquida de ionización electrospray-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre un espectrómetro de masa LTQ-FT. Las secuencias de las regiones variables de la HC y la LC se obtuvieron a partir de la superposición de secuencias de péptidos obtenidas por las distintas divisiones proteolíticas. Para el análisis de los péptidos por LC-MS/MS una columna de cromatografía de fase inversa micro-capilar CI 8 (0,15 x 150 mm de diámetro, 5 µm, 300Å) fue empleada usando un flujo de 1 µL/minuto en un AGILENT TM serie 1100 sistema capilar LC. Se aplicó el solvente A, y un gradiente del 2 al 80% de solvente B fue aplicado, el solvente A consistente en 0,1% v/v de ácido fórmico en agua y disolvente B que consiste de 0,1% v/v de ácido fórmico en acetonitrilo. El LC fue acoplado en línea con el espectrómetro de masa LTQ-FT, y los péptidos con m/z entre 350 y 1800 se analizaron en el modo dependiente de los datos con las cinco especies más abundantes en cada encuesta de exploración de masa siendo seleccionadas para una disociación inducida por choque (CID siglas en inglés). El espectro CID resultante fue examinado con el programa de búsqueda MASCOT para encontrar las coincidencias exactas con las secuencias de la base de datos, y las secuencias potencialmente nuevas fueron determinadas por interpretación manual *de novo*. Los péptidos que no pudieron ser completamente secuenciados, o que contenían el par de aminoácidos isobáricos leucina/isoleucina y glutamina/lisina fueron adicionalmente analizados utilizando la degradación de Edman.

Una porción Fab del anti-LTα se obtuvo de la digestión con papaína de los anticuerpos intactos seguido por cromatografía de exclusión de tamaño. Las masas de las dos cadenas pesada y ligera, componentes del Fab fueron obtenidos espectrometría de masas por cuádruple TOF después que los enlaces

5 disulfuros entre las cadenas fueron reducidos. Las masas experimentales correspondieron con las calculadas sobre la base de las secuencias obtenidas de la cadena pesada y cadena ligera dentro de 0,5 Da a cada una.

La secuencia de la cadena ligera anti-LTα para la quimera 3F12.2D3:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLF

10 YWASTRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGT
KLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN
GVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPGVKSFNR
NEC (SEQ ID NO: 64)

Secuencia de la región variable de la cadena pesada anti-LTα que abarca la

15 región constante de la quimera 3F12.2D3:

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPG
SGSTNYNEEFKGGKATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCADGYHGYWGQ
GTTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSL
SSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPS

20 GPIST (SEQ ID NO:65)

donde N es cualquier aminoácido.

La Figura 1C muestra a región variable de la cadena ligera para este clon, así como la región constante de cadena ligera como se obtuvo por homología con otros anticuerpos, pero no por secuencia de sí misma.

25 La Figura 1D muestra la región variable de la cadena pesada de este clon, así como la región constante de la cadena pesada obtenida por homología con otros anticuerpos.

2. La síntesis de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos derivados del quimérico 3F1 2

Utilizando como molde un plásmido basado en pRK que contiene el gen de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-TGF-beta 2G7 (WO 2005/97832), y las secuencias de aminoácidos derivados anteriormente, se realizaron varias rondas de mutagénesis dirigida de oligonucleótido para obtener el gen de la

5 cadena ligera de anticuerpo quimérico 3F12. Del mismo modo, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2G7 es el molde para la construcción de la cadena pesada de 3F12. Tanto los moldes de cadena ligera como de pesada contenían los dominios de región constante humana, C kappa para la cadena ligera, y CH1, la bisagra, CH2, CH3 del isotipo IgG1, de la cadena pesada. Los oligonucleótidos

10 utilizados en la síntesis de las cadenas ligera y pesada se indican a continuación. Los oligonucleótidos para la síntesis de la cadena ligera quimérica de 3F12:

CAL845

GCT CAT AGT GAC CTT TTC TCC AAC AGA CAC AGC CAG AGA TGA TGG
CGA CTG TGA CAT CAC GAT ATC TGA ATG TAC TCC (SEQ ID NO:66)

15 CAL846

GCT GTA AGT CCA GTC AAA GTC TTT TAT ACA GTA CCA ATC AGA AGA
ACT TCT TGG CCT GGT ACC AGC (SEQ ID NO: 67)

CAL847

GCG ATC AGG GAC ACC AGA TTC CCT AGT GGA TGC CC (SEQ ID NO:68)

20 CAL848

GCC ACG TCT TCA GCT TTT ACA CTG CTG ATG G (SEQ ID NO:69)

CAL849

GGT CCC CCC TCC GAA CGT GCG CGG GTA GGA GTA GTA TTG CTG ACA
GTA ATA AAC TGC CAG GTC (SEQ ID NO:70)

25 Oligonucleótidos para la síntesis de la cadena pesada del quimérico de 3F12:

CAL850

GCT GCA GCT GAC CTT CTG AAT GTA CTC C (SEQ ID NO:71)

CAL851

GCC TTG CAG GAG ATC TTC ACT GAA GCC CCA GGC TTC ATC AGC TCA
GCT CC (SEQIDNO:72)

CAL852

CCC ACT CTA TCC AGT AAC TAG AGA AGG TGT ATC CAG TAG CCT TGC
5 AGG (SEQ ID NO:73)

CAL853

CCA CTT CCA GGA CTA ATC TCT CCA ATC CAC TCA AGG CCA TGT CCA
GGC C (SEQ ID NO: 74)

CAL854

10 GCC CTT GAA CTC CTC ATT GTA ATT AGT ACT ACC ACT TCC AGG (SEQ ID
NO:75)

CAL855

CCG CAG AGT CCT CAG ATG TGA TCA GGC TGC TGA GCT GGA TGT AGG
CAG TGT TGG AGG ATT TGT CTG CAG TGAATG TTG CCT TGC C (SEQ
15 IDNO:76)

CAL856

GGC TGA GGA GAC GGT GAC TGT GGT GCC TTG GCC CCA GTA GCC ATG
GTA CCC GTC TGC ACA GTA ATA GAC CTC (SEQ IDNO:77)

CAI871

20 CCA GAC TGC TGC AGC TGA CCT TGT GAA TGT ACT CCA GTT GC (SEQ ID
NO: 78)

Dado que el anticuerpo monoclonal murino 3F12 original tenía el isotipo de IgG2b,
los dominios constantes murinos para las cadenas ligera y pesada de este isotipo
fueron intercambiados por los dominios constantes humanos en la quimera,
25 dando un anticuerpo completamente murino. El isotipo murino IgG2a también se
construyó para estudios de comparación. El ADN para las cadenas ligera y
pesada de cada variante fue co-transfectado en una línea celular de riñón de
embriones humanos transformadas con un adenovirus, 293, para la expresión
transitoria, y la proteína fue purificada de los medios acondicionados utilizando

una cromatografía de afinidad en proteína A. Mediante un ELISA se comparó la unión a LTα entre el anticuerpo monoclonal 3F12 original obtenido de ascitis, y las variantes sintéticas mulgG2a y mulgG2b.

Brevemente, una placa NUNC MAXISORP™ fue recubierta con dos microgramos por ml de LTα (como se describe en el ejemplo 1 anterior) en solución tampón carbonato 50 mM, pH 9.6, toda la noche a 4 ° C y, a continuación, bloqueados con el 0,5% de BSA, 10 PPM PROCLIN™ en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Las diluciones seriadas de las muestras en PBS que contiene 0,5% de BSA, 0,05% de Tween™, 10 PPM PROCLIN™ se incubaron en las placas durante 2 horas. Después del lavado, el anticuerpo unido se detectó con anti- Fc humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) usando como sustrato 3,3', 5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La Absorbancia fue leída a 450 nm. Tanto las variantes clonadas IgG2a e IgG2b se unieron de manera similar al anticuerpo original 3F12 purificado de ascitis, lo que indica que se ha sintetizado la secuencia correcta.

3. Humanización de 3F12

Usando la secuencia de aminoácidos del clon quimérico, se identificaron los residuos de las CDRs de las cadenas ligera y pesada (Kabat). La mutagénesis dirigida de oligonucleótido se utilizó para intercambiar estas CDRs en los vectores que contenían la secuencia de codificación de las cadenas ligera y pesada de la versión 5 del humanizado anti-TGFβ 2G7 (WO 2005/97832), obteniéndose la versión de 3F12 con intercambio de las CDRs. Las secuencias de la región de marco, derivadas de esta manera son secuencias consenso para la kappa VL del subgrupo I y para la VH del subgrupo III, respectivamente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 51)-LI-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:55)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:53)-L3- FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 54) y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:46)-H1-WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:45)-H2 -RATFSADNSKNTA YLQMNSLRAEDTA VYYCAD (SEQ ID NO: 50)-H3 -WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 49).

Después de la expresión y purificación como se ha descrito anteriormente, la unión a LTA de la versión con intercambio de las CDRs se comparó con la quimera. La versión con intercambio de las CDRs perdió casi por completo la unión.

- 5
- Para restaurar la unión de los anticuerpos humanizados, las mutaciones se construyeron utilizando el ADN de la versión con intercambio de las CDRs como molde. Utilizando un modelo generado por computadora, estas mutaciones se han diseñado para cambiar residuos de las regiones de marco humanas por sus homólogos murinos en las posiciones en que el cambio podría afectar a la
- 10
- conformación de las CDRs de la superficie del sitio de unión del anticuerpo con el antígeno. Las mutantes y sus uniones relativas medidas por ELISA como se ha descrito anteriormente se muestran en la Tabla 1.

El cambio de isoleucina 69 por fenilalanina, para dar v2, incrementó significativamente la unión, al igual que el cambio Leu78Ala, mientras que el

15

cambio Asn73Lys no dio mejora con respecto a la versión con intercambio de las CDRs. La combinación Ile69Phe y Leu78Ala dio la versión 5, que se une a LTA aproximadamente 5 veces menos que la quimera en este formato de ensayo ELISA.

Se hicieron dos variantes para mover la región de marco más cerca de la

20

secuencia humana consenso. La versión 6, con los cambios Lys24Arg y Ser25Ala, fue equivalente en unión a la versión 5. Sin embargo, un intento de cambiar el habitual de ácido aspártico en la posición 94 por la arginina consenso (versión 7) resultó en la pérdida casi completa de la union.

TABLA 1

25

3F12	Cadena Pesada (VH) Cadena Ligera (VL)		
Variante	sustituciones	sustituciones	Union Relativa
Quimera			1
CDR cambiado	(CDR cambiado)	(CDR cambiado)	no se une
V2	I69F	(CDR cambiado)	>1000x abajo
V3	N73K	(CDR cambiado)	>1000x abajo

V4	L78A	(CDR cambiado)	>500x abajo
V5	I68F	(CDR cambiado)	5 a 20 veces por abajo
V6	(CDR cambiado)	K24R, S25A	5 a 20 veces por abajo
V7	D94R	(CDR cambiado)	no se une

* Estos valores están referidos a la quimera original (con la cadena pesada de ID SEC NO: 35 y la región variable de cadena pesada enunciados en la Figura 1B), que más tarde fue descubierto que tenía una serina "extra" en FR3 de la cadena pesada (una serina después de la L en posición c en ID SEC NO: 29 en la Figura 3B). Esta serina fue sacada para hacer chimera2 (que tiene la región variable de la cadena pesada de ID SEC NO: 38 en la Figura 1D), y la unión por el ensayo de ELISA resultó ser el mismo que el anterior.

Todos los estudios con animales que se describen a continuación que utilizaron la quimera 3F12 se refieren a la quimeram original, y no a la chimera2 como se describe en la nota anterior.

4. Maduración de afinidad del anticuerpo 3F12

Para la identificación de los residuos y las regiones en las CDR que podrían ser más importante para la unión a LTα y, por tanto, los candidatos para su inclusión en las bibliotecas de exposición en fagos para la maduración de afinidad, se realizó la exploración parcial de alanina, utilizando v5 molde de simple cadena para la mutagénesis dirigida de oligonucleótidos.

Como se muestra en la Tabla 2, se encontraron varios residuos que, cuando se produjo la mutación a alanina produjeron una pérdida o ganancia de la unión a LTα.

TABLA 2

Versión No.	Posicion	Union relativa
	L1	
13	Y31A	3.40
14	T33A	0.72
15	N34A	0.49
16	K36A	3.70
17	F38A	0.32
	L3	
18	Q89A	4.20
19	Y91A	2.30
20	Y92A	0.71
21	S93A	0.82
22	Y94A	14.30
23	R96A	18.20
	H2	
24	G53A	34.10
25	G55A	1.20
26	S56A	1.07
27	N58A	1.70
28	Y59A	2.73
29	N60A	2.31
30	E61A	1.78
31	E62A	1.93
	H3	
8	G95A	>100
9	Y99A	10.00
10	H100A	>100
11	G101A	
12	Y102A	0.81

5

** La proporción de la EC50 de la variante, dividida por la EC50 de la versión 5 en la placa de ELISA contra LTα. Un número mayor significa una unión más débil, los números > 1 significan que la unión es menor que la de la versión 5.*

10 *Así pues, las versiones 14, 15, 17, 20, 21, y 12 tienen posiciones donde los cambios podrían hacerse para mejorar la afinidad, y se espera que las sustituciones conservadoras (o incluso no-conservadora, en algunos casos, según sea determinado por el artesano experto en ensayos de rutina) podrían hacerse en las respectivas posiciones para aumentar de unión.*

EJEMPLO 3: Preparación del anticuerpo quimérico 2C8 y humanización

15 1. Preparación del anticuerpo quimérico

Las regiones variable de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 2C8 anti-LT α que se unió y neutralizó LT α 3 y LT α 3 fue clonado en un formato de anticuerpo quimérico murino/humano esencialmente como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 para la clonación de S5H3.

- 5 Los cebadores utilizados para la RT-PCR, fueron los siguientes:

Cadena ligera de 2C8:

Cebador 5': GCC ATA GAT ATC GTR ATG CAN CAG TCT C (SEQ ID NO: 79)

Cebador 3': TTT KAT YTC CAG CTT GGT ACC (SEQ ID NO:80)

Cadena pesada de 2C8:

- 10 Cebador 5': GAT CGA CGT ACG CTG AGG TYC AGC TSC AGC TSC AGC AGT CTG G (SEQ ID NO: 81)

Cebador 3': ACA GAT GGG CCC TTG GTG GAG GCT GMR GAG ACD GTG ASH RDR GT (SEQ ID NO: 82).

en donde K = G o T, S = C o G, D = A o G o T, M = A o C, H = A o C o T, N es T,

- 15 G, A, o C (cualquier ácido nucleico de estos cuatro), R = A o G, Y = C o T.

El dominio variable de la cadena ligera fue clonado en el vector pRK.LPG3. Kappa Humana que contiene el dominio constante humano kappa, mientras que el dominio variable de la cadena pesada fue clonado en el vector de expresión pRK.LPG4. HC Humana que codifica el dominio constante de la IgG1 humana

- 20 completa. Estos vectores son los derivados de los vectores descritos anteriormente para la expresión de IgGs en las células 293 (Shields et al, *J Biol Chem*, 276:6591 - 6604 (2000) y Gorman et al, *DNA Prot. Eng. Tech*, 2:3-10 (1990)). Para la expresión transitoria del anticuerpo, estos plásmidos fueron co-transfectadas en las células 293 o la línea celular de mamíferos CHO y las
- 25 proteínas purificadas como se describe en el Ejemplo 1.

Este anticuerpo quimérico 2C8 fue utilizado en la experimentación con animales descrita a continuación.

2. Humanización de 2C8

- La humanización del anticuerpo 2C8 anti-LT α se llevó a cabo en una serie de
- 30 pasos de mutagénesis sitio-dirigida. Usando la secuencia de los dominios

variables de la quimera, los residuos de las CDR de las cadenas ligera y pesada fueron identificados mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos de estos dominios con las secuencias conocidos de anticuerpos (*Kabat et al, supra*). Las CDRs se definieron sobre la base de la secuencia hipervariable (*Kabat et al, supra*) y se muestran en la Figura 2.

El intercambio de las CDRs de 2C8 se realizó utilizando mutagénesis de oligonucleótidos sitio-dirigida, en la que las regiones CDRs se pusieron en vectores separados derivados de pRK5 para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Estos vectores contienen el dominio constante de la cadena ligera humana kappa I o para el vector de la cadena pesada, el dominio constante CH1 de IgG1 humana, la bisagra, CH2 y CH3 (Gorman, *Current Opinion in Biotechnology*, 1, (1), P36 - 47 (1990)).

La comparación con otros anticuerpos humanizados indicó que la cadena ligera de 2C8 es muy similar a la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-HER2 4D5 (US 5821337), mientras que la cadena pesada de 2C8 tiene una secuencia similar a la del anti-TGF- β 2G7 (WO 2005/97832). Por lo tanto, un vector que contiene la cadena ligera rhuMAb 4D5 se utilizó como molde para la construcción de la cadena ligera del 2C8. La mutagénesis sitio-dirigida se realizó en un molde que contiene desoxiuridina derivado de este vector, utilizando oligonucleótidos con las secuencias de la cadena ligera que aparecen en la Tabla 3. Además, el oligonucleótido CA1730 se utilizó para revertir la secuencia de la región de marco 3 por la secuencia consenso de humanos kappa.

TABLA 3

Oligonucleótidos para 2C8 (cadena ligera)

25	Sustitución	Secuencias de oligonucleótidos
	CDR- LI	CC TGG TTT CTG TTG ATA CCA GGC TAC AGC GGA AGA CAC AGC CTG ACT GGC ACG GCA GG (SEQ ID NO: 83)
	CDR-L2	GCG AGA AGG GAC TCC AGT GTA ACG GTG GGA TGC AGA GTA AAT CTG TAG TTT CGG AGC (SEQ ID NO: 84)
30	CDR-L3	GGT ACC CTG TCC GAA CGT CCA AGG AGT AGA ATA ATG TTG CTG ACA GTA ATA AGT TGC (SEQ ID NO:85)

R66G (CA1730) GGT CAG AGT GAA ATC CGT CCC AGA TCC GGA TCC
AGA GAA GCG (SEQ ID NO:86)

(Todos los oligonucleótidos se ordenaron como complementos inversos de la
cadena codificante ya que el fl ori en los vectores pRK está en la orientación
5 inversa a la orientación en los vectores basados en pBR.)

Para la cadena pesada, el molde que contiene la desoxiuridina-se obtuvo a partir
de un vector que contiene la cadena pesada del anticuerpo humanizado 2G7 (WO
2005/97832) utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4. La
región de marco se convirtió en consenso utilizando los oligonucleótidos KM55,
10 KM56 y KM61.

TABLA 4

Oligonucleótidos para 2C8 (cadena pesada)

	CDR-H1	GGC CTG ACG GAC CCA ATG GAT CAC ATA GCT GGT GAA TCT GTA GCC AGA AGC TGC (SEQ ID NO:87)
15	CDR-H2	CCC CTT GAA CTT CTC GTT ATA GTT GGT GCC GTC GTT ATA AGG ATT GTT ATA ACC AAC CCA CTC GAG GCC (SEQ ID NO:88)
	CDR-H3	GGT TCC TTG ACC CCA GTA GGC GAA CCA TGG GAG CAT TGT GGG TCG AGA ACA ATA ATA GAC GGC AGT GTC CTC AGC (SEQ IDNO:89)
20	KM55	CC GTC GTT ATAAGG ATT GTT ATA ACT AAC CCA CTC GAG GCC (SEQIDNO:90)
	KM56	CAT CTG CAG GTA TAG TGT GTT TTT CGA ATT GTC ACG ACT GAT AGT GAA GCG CCC CTT GAA C (SEQIDNO:91)
25	KM61	CCA TGG GAG CAT TGT GGG TCGAGC ACA ATAATA GAC GGC AGT GTC C (SEQ ID NO:92)

Las cadenas ligera y pesada que comprenden el intercambio de las CDRs, v10,
derivadas de esta manera, fueron co-transfectadas en una línea celular 293de
riñón de embriones humanos transformada con adenovirus (*Graham et al, supra*).
30 Los anticuerpos fueron purificados a partir del sobrenadante del cultivo utilizando

la resina proteína A-SEPHAROSE CL-4B TM y, a continuación, un cambio de solución tamponada para una solución de succinato de sodio 10 mM, 140 mM NaCl, pH 6.0, y se concentra mediante un concentrador CENTRICON-10 TM (Amicon).

5 Para la medición de las afinidades de unión relativa a LTα de la versión con las CDR intercambiadas, y las posteriores variantes de 2C8, se usó el ELISA en placa tal como se describe más arriba.

Como se muestra en el cuadro 5, la versión con las CDR intercambiadas, v10, mostró que no se unia a LTα en el ELISA. La versión 2 y versiones posteriores
10 fueron construidas para recuperar esta unión. La versión 2 recupera la unión equivalente a la quimera, pero contiene siete residuos que no son consenso. Se estudiaron mas variantes para obtener una región de marco lo más cerca posible a un consenso al tiempo que sigue manteniendo o mejorando la unión en comparación con la quimera. La versión 12 tiene una unión equivalente a (medida
15 por ELISA), o ligeramente mejor que (análisis por Biacore TM), la quimera, y conserva sólo cinco residuos no consenso. Las secuencias de las cadenas ligera y pesada de las versiones 7 y 12 se presentan en la Figura 2C.

TABLA 5

20	Versión		ELISA IC ₅₀				mutaciones
	2C8	HC	LC	razón	Biacore TM	(rhLTα)	
					KD	Ka/kd	
	v0	v0	vo	1	0.6nM		
	v2	v2	v1	1.7	0.2nM	6e5/1e-4	
	v3	v3	v1	10.2			
	v4	v4	v1	27.8			
	v7	v2	v2	1.2	0.4nM	55e5/1.6e-4	LC.Q46L
	v8	v8	v1	no se une			HC.G49S.S93A
	v10	v10	v1	no se une			CDR cambiado
	v12	v12	v2	1	0.07nM	2e6/0.9e-4	HC.A67F

v13	v13	v2	2.4			HC.S71R
V14	V14	V2	2			HC.K73N
V15	V15	V2	11.1			HC.A93S
V16	V12	V3	0.6			LC.Q46L.E89Q. S90H
vX	vX	V3	0.3			HC.D53A.A67F

3. Maduración de afinidad de 2C8

Un anticuerpo monoclonal humanizado de 2C8 con la afinidad por LTα mejorada fue seleccionado de una biblioteca de fragmentos monovalentes Fab expuesta en fagos. Se generó un molde que muestra el Fab humanizado 2C8.v2 y contiene un codón de parada en la CDR-L3.

Los oligonucleótidos (que figuran en la Tabla 6) se han diseñado para aleatorizar suave los residuos específicamente de la CDR-L3 y la CDR-H3.

TABLA 6

10 Los oligonucleótidos para la maduración de la afinidad de 2C8 CDR-L3 y CDR-H3 por aleatorización suave

Nombre del Oligonucleotido	Secuencia ¹
KM73.2C8.fago.v3.LC3.suave	GGA AGA CTT CGC AAC TTA TTA CTG TCA G75 575 885 887 857 8CC T86 6AC GTT CGG ACA GGG TAC CAA GGT GG (SEQ ID NO:93)
KM74.2C8.fago.v3.HC3.suave	G GAC ACT GCC GTC TAT TAT TGT TCT CGA CCC 575 576 787 CCA 866 887 677 TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTG G (SEQ ID NO:94)

¹ El código de aleatorización suave (A = 5, G = 6, C = 7 y T = 8): cada base degenerada es el 70% del tipo salvaje con un 10% de cantidades equimolares de los otros tres nucleótidos añadidos.

15 Tres rondas de clasificación sobre LTα se utilizaron para la captura selectiva de moléculas de Fab de alta afinidad con menos de 2 nM de unión al antígeno. Para la primera ronda, los fagos fueron capturados por 2 horas frente a placas

recubiertas con 2 µg/ml de LTα a temperatura ambiente. La segunda y tercera rondas de selección se realizó a temperatura ambiente mediante la captura de los fagos por 30 minutos con 2 nM LTα biotinilado en solución, seguida de la captura en placas recubiertas con neutravidin. El clon de mayor afinidad fue identificado mediante un ELISA competitivo. Una concentración constante de los clones de fagos (normalizado por la OD de unión de LTα a la fase sólida) fueron incubadas con concentraciones crecientes de LTα (0-50 nM) en solución antes de la captura sobre una placa recubierta con 2 µg/ml de LTα. Un clon manifestó un incremento de 10 veces en competencia con LTα sobre el tipo salvaje 2C8.v2. La secuenciación del ADN de este clon de fagemido reveló dos cambios de aminoácidos en la CDR-L3 en comparación con la secuencia del tipo salvaje 2C8: la glutamina en la posición 89 se ha cambiado por un ácido glutámico, y la histidina en la posición 90 se ha cambiado por una serina. Estos dos cambios en la CDR-L3 se introdujeron por mutagénesis sitio-dirigida en la cadena ligera del tipo salvaje 2C8.v7. Cuando la cadena ligera de v7 fue transfectada en las células 293 con la cadena pesada 2C8.v12 para dar 2C8.v16, el anticuerpo resultante mostró un incremento del doble de la unión de la IgG a LTα por ELISA en comparación con 2C8.v2 (Tabla 5).

Para incrementar la estabilidad, mediante la eliminación de un posible sitio de isomerización de ácido aspártico, el asp 53 en la CDR2 de la cadena pesada se cambió por alanina. La variante resultante 2C8, vX, mostró un incremento de 3,5 y 3 veces en la unión a LTα por ELISA, en comparación con el 2C8.v2 y la quimera 2C8, respectivamente (Tabla 5).

La Tabla 7 a continuación muestra como los cambios de residuos en las regiones CDR-L3 fueron clasificadas según la capacidad de unirse a LTα mediante análisis por ELISA.

TABLA 7

Phagemid clone	CDR-L3 Sequence ^{1,2}	rhLTα Competitive ELISA IC ₅₀ (nM)
Wild-type	QQHYSTPW T (SEQ ID NO:9)	3.14
A8	QESYSTPW T (SEQ ID NO:10)	0.32
G7	QENYSTPW T (SEQ ID NO:11)	0.57
H6	QEVYSTPW T (SEQ ID NO:12)	1.1
C12	QEHYSTPW T (SEQ ID NO:95)	3.41
H9	QQHYTTPW T (SEQ ID NO:96)	3.80
G2	QQVYSTPW T (SEQ ID NO:97)	4.51
G12	QKTFTPW T (SEQ ID NO:98)	5.34
D8	QQFTSTPW T (SEQ ID NO:99)	136.62
E2	QQKYSTPW T (SEQ ID NO:100)	not determined ³

La maduración de afinidad de 2C8 por exposición en fagos: cambios en la secuencia en las regiones CDR-L3 del fagemido clasificadas por su capacidad para competir rhLTα

¹ Negrita y cursiva indica los residuos de tipo aleatorio.
² Todos los fagemidos retuvieron la secuencia de CDR-H3 del tipo salvaje
³ El clon E2 no entontró el umbral de unión de hrLTα por ELISA directo (de OD = 1) necesario para la normalización de los fagemidos en el ELISA competitivo.

10 Puede verse en esta Tabla que los mejores clones fueron el A8, el G7, y el H6, los cuales se unen a rhLTα con mayor afinidad que la del clon de tipo salvaje.

EJEMPLO 4: Los anticuerpos anti-LTα inhiben la artritis (AIA, siglas en ingles) inducida por anticuerpos

15 La AIA difiere de la artritis inducida por colágeno (CIA), que se describe a continuación, en que, en lugar de la inyección del antígeno (colágeno bovino tipo II), se inyectan los anticuerpos que reconocen el colágeno de tipo II. De esta manera, la respuesta adaptativa de las células T y B son eludidas para inducir directamente las funciones efectoras sobre los macrófagos y neutrófilos a través de los receptores Fc y de la activación mediada por el complemento.

AIA fue inducida en ratones por la inyección i.v. de una combinación de cuatro anticuerpos monoclonales diferentes generados por la ARTHROGEN-CIA™ líneas celulares de hibridom a-B de ratón. Tres de los anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos autoantigenicos agrupados dentro de un fragmento de 84
5 residuos de amino-ácido, LyC2 (el más pequeño fragmento artrítico de colágeno de tipo II), de CB 11, y el cuarto anticuerpo monoclonal reacciona con el LyC 1. Los cuatro anticuerpos reconocen los epitopos conservados del colágeno del tipo II compartidos por varias especies y tienen reacción cruzada con colágeno tipo II homólogo y heterólogo.

10 Todos los grupos (n = 5/grupo) recibieron 2 mg de un cóctel de anticuerpos monoclonales iv en 100 µl de PBS en el día 0 seguido de 25 µg de LPS ip en 50 µl de PBS en el día 3. Los animales fueron tratados en el día -1 (preventivo) o día 4 (terapéutico) con 10 mg/kg del isotipo de control (contra la ambrosía), el anticuerpo S5H3 anti-LTα quimérico hámster-murino (como un sustituto para los
15 anticuerpos anti-LTα humana), la mutante anti-LT.Fc (un anticuerpo anti-LTα con mutaciones DANA en la región Fc como se describe a continuación), o TNFRII.Fc (una inmunoadhesina TNFR.Ig) por vía intraperitoneal o subcutánea. La hinchazón de las patas fue observada durante 14 días. A cada pata se le dio una puntuación de 0-4, para un total máximo de 16 por animal.

20 Las mutaciones DANA en la mutante anti-LT.Fc usada en este ejemplo y otros a continuación se refieren solo a dos cambios de posición en la región Fc de la IgG de ratón o de humano. Estos cambios son D (ácido aspártico) por A (Alanina) en la posición 265 y N (asparagina) por A (Alanina) en la posición 297. La mutante DANA fue construida por la introducción de residuos de alanina en las posiciones
25 265 y 297 de la IgG humana o de ratón mediante el método de mutagénesis dirigida a sitios específicos y basada en la PCR (GENE TAILOR™, Invitrogen Corp.).

La Figura 4A muestra el promedio de la puntuación clínica para el tratamiento profiláctico de cada uno de los grupos que se han descrito anteriormente en
30 función de días después de la inducción. Se puede observar que de todos los grupos de tratamiento, el anticuerpo S5H3 es el más efectiva en este modelo, incluidas las moléculas mutantes TNFRII.Fc y la anti-LT.Fc. Por lo tanto, el

anticuerpo S5H3 inhibió significativamente el desarrollo de la artritis en este modelo inducido por el anticuerpo. El anti- LT α con la mutación DANA Fc (la mutante anti-LT.Fc) no tuvo eficacia, lo que indica que la muerte mediada por Fc de las células que expresan LT α es necesaria para la eficacia (Figura 4A).

- 5 La Figura 4B muestra la media de la puntuación clínica para el tratamiento de cada uno de los grupos descritos anteriormente en función de los días después de la inducción. Los resultados muestran que el anticuerpo S5H3 inhibe significativamente el desarrollo de la artritis en este modelo inducido por el anticuerpo cuando se administra terapéuticamente, frente a las otras moléculas
10 ensayadas.

En conclusión, los animales tratados con la quimera hámster-ratón S5H3 redujo significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con los animales tratados con S5H3.DANA o con control. El S5H3 demostró eficacia tanto profiláctica como terapéutica en este modelo animal.

15 **EJEMPLO 5:** El anti-LT α inhibe la artritis inducida por colágeno (CIA)

- En la RA la membrana sinovial de múltiples articulaciones se pueden inflamar, lo que lleva a la destrucción de tejidos, incluyendo conjuntos de huesos y cartílagos. La sinovial en la RA puede estar altamente inflamatoria en la naturaleza y se caracteriza por la infiltración de células mononucleares y linfocitos, la activación
20 de las células T y de las células presentadoras de antígenos (APC), la secreción de inmunoglobulina (Ig) de las células B, y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Potocnik *et al*, *Scand. J. Immunol.*, 31: 213 (1990); Wernick *et al*, *Arthritis Rheum.*, 28:742 (1985), Ridley *et al*, *Br. J. of Reumathology.*, 29:84 (1990); Thomas *et al*, *J. Immunol*, 152:2613 (1994) y Thomas *et al*, *J. Immunol*,
25 156:3074 (1996)). La sinovial crónicamente inflamada esta normalmente acompañada de la infiltración masiva de células T CD4 (Pitzalis *et al*, *Eur. J. Immunol*, 18: 1397 (1988) y Morimoto *et al*, *Am. J. Med.*, 84:817 (1988)).

- La Artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal para la RA humana, que se asemeja a las enfermedades humanas, y puede ser inducida en cepas de
30 ratones susceptibles de inmunización heteróloga con colágeno tipo II (CII) (Courtenay *et al*, *Nature*, 283:665 (1980) y Cathcart *et al*, *Lab. Invest.*, 54:26

(1986)). Tanto las células T CD4 y como los anticuerpos contra el CII son requeridos para desarrollar la CIA. La transferencia de anti-CII a animales vírgenes sólo conduce a la histopatología parcial que es muy diferente de la CIA, y no se desarrollan todos los síntomas de la CIA (Holmdahl et al, *Agents Action*, 5 19:295 (1986)). En cambio, la transferencia adoptiva tanto de células T CD4 como de los anticuerpos anti-CII obtenidos de ratones inmunizados con CII en los aceptores vírgenes, reconstituye completamente los síntomas clásicos de la CIA (Seki, et al., *J. Immunol*, 148:3093 (1992)). La participación de los anticuerpos y las células T en la CIA es también coherente con los hallazgos histo-patológicos 10 de las articulaciones inflamadas en la CIA. De esta manera, los agentes que bloquean las funciones de las células B o de las células T, o inhiben las citocinas pro-inflamatorias inducidas por las células T, pueden ser eficaces para prevenir o tratar la artritis. En efecto, el agotamiento de las células T CD4, el bloqueo de la interacción CD40-CD40L, la neutralización del TNF- α , o el bloqueo de los 15 receptores de IL-1 puede dar lugar a la prevención de la CIA en los ratones (Maini et al, *Immunol. Rev.*, 144: 195 (1995); Joosten et al, *Arthritis Rheum.*, 39:797 (1996), y Durie et al, *Science*, 261: 1328 (1993)).

En el modelo de CIA utilizado en la presente especificación, los ratones DBA-1J fueron inmunizados intradérmicamente con 100 μ g colágeno bovino tipo II en 100 20 μ l de adyuvante completo de Freund (CFA) en el día 0 y el día 21. El día 24 después de la inmunización, los ratones fueron divididos aleatoriamente en los grupos de tratamiento. Los animales fueron tratados por vía subcutánea o bien con 6 mg/kg en 100 μ l del anticuerpo monoclonal gG2a anti-ambrosía (anticuerpo de control) o con el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-ratón (S5H3), la 25 mutante anti-LT α .Fc, o el TNFRII-Ig murino a 4 mg/kg en 100 PBS.

Los animales fueron tratados tres veces por semana durante la duración del estudio. Las extremidades de los animales fueron examinados diariamente para detectar signos de infiltración en las articulaciones mediante un sistema de clasificación de 1 -4 para cada articulación, dando una puntuación máxima de 16.

30 En un modelo de prevención de la CIA, el uso del el anticuerpo anti-LT α quimérico hámster-ratón (S5H3), y de TNFRII.Fc redujo el promedio de la puntuación clínica durante el período de días a través de 70 días frente a mutante la anti-

S5H3.DANA Fc y del isotipo de control (del anticuerpo monoclonal IgG2a anti-ambrosía). Véase la Figura 5A, mostrando una eficacia comparable en la prevención de la CIA en el modelo murino entre el anticuerpo S5H3 y el TNFR.Ig.

La Figura 5B muestra una eficacia comparable entre el anticuerpo anti-LTα quimérico hámster-ratón (S5H3), y el TNFRII.Fc con más de 90 días en este modelo murino terapéutico de CIA, cuya eficacia es mucho mejor que la del isotipo de control en la reducción media de la puntuación clínica. Estos resultados, junto con los de la Figura 5A muestran que los anticuerpos en la presente especificación se consideran útiles en la prevención y son eficaces en las enfermedades autoinmunes como la RA. Se espera que los anticuerpos anti-LTα de la presente especificación serán eficaces en la prevención y el tratamiento de la RA en aquellos que no son sensibles a las terapias TNF en general, incluidas las TNFR.Ig y los anticuerpos anti-TNFα, de forma que los que no responden pueden ser tratados con estos anticuerpos de manera profiláctica y efectiva.

EJEMPLO 6: El anti-LTα retrasa el inicio y la gravedad de la enfermedad encefalomiелitis (EAE) en ratones transgénicos MBP-TCR

La encefalomiелitis experimental autoinmune/alérgica (EAE) es una condición inflamatoria del sistema nervioso central con similitudes con la MS (siglas en ingles). En ambas enfermedades, leucocitos circulantes penetran la barrera hemato-encefálica y los dañan la mielina, lo que resulta en alteración de la conducción nerviosa y la parálisis. El modelo murino de EAE (modelo de prevención ratón transgénico) se ha descrito como un modelo para la MS (Grewal *et al.*, *Science*, 273: 1864-1867 (1996)).

Los ratones transgénicos para el receptor de células T MBP_{AC1-11} (los ratones transgénicos MBP-TCR generados a partir de un par de animales de cría obtenidos a partir de el Dr. Richard Flavell, Instituto Médico Howard Hughes, Universidad de Yale, de 10-a-15 semanas de edad, machos y hembras adultos) fueron inmunizados con 10 µg de MBP_{AC1-11} en 100 µl de CFA por vía subcutánea. Los días 1 y 2, todos los ratones fueron inyectados adicionalmente por via intraperitoneal con toxina pertussis a 200 ng/100 µl/ratón. El día 0, los ratones (n = 10/grupo) recibieron eln anticuerpo monoclonal anti-gpl20 IgG1 (anticuerpo de

control) o el anticuerpo quimerico hámster-ratón anti-LT α S5H3 de a 6 mg/kg en 100 μ l ip y luego 6 mg/kg en 100 μ l de PBS s. c. tres veces por semana.

Los animales fueron evaluados diariamente por signos clínicos utilizando el siguiente sistema de clasificación: 0 - ratón normal, no manifiesta signos de la enfermedad; 1 - cola-floja o debilidad de las extremidades posteriores, pero no ambas; 2 - cola-floja y debilidad de las extremidades posteriores; 3 - parálisis parcial de miembros posteriores, 4 - parálisis completa de miembros posteriores; 5 - moribundos.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La puntuación de la enfermedad fue menor para los ratones tratados con el anti-LT α que para el grupo control, sólo alcanzando puntuaciones clínicas de 3 (frente a puntuaciones clínicas de más de 4 para el control) durante el estudio. Los resultados muestran que el anticuerpo S5H3 retrasó la aparición y gravedad de la enfermedad EAE en estos ratones transgénicos, lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpos protegen a los ratones de desarrollar abiertamente la EAE.

EJEMPLO 7: El tratamiento con el anticuerpo anti-LT α no afecta la respuesta isotípica de anticuerpos dependiente de las células T, lo que indica seguridad

La respuesta inmune al trinitrofenol (TNP)-FICOLL TM inyectado i.v. es muy elevada en la mayoría de las cepas de ratón, lo que permite probar la seguridad relativa de un anticuerpo administrado a dichos ratones por la medición diversos niveles del isotipo en los ratones.

Los ratones BALB/c (n = 12/grupo) fueron tratados en el día 0 con el isotipo control anti-ambrosía, con el anticuerpo anti-LT α hámster-ratón de (S5H3), la mutante anti-LT.Fc, o CTLA4-Fc (como un control positivo) a 6 mg/kg en 100 μ l de PBS intraperitoneal. El tratamiento continuó tres veces por semana durante 5 semanas. Los ratones fueron inmunizados en el día 1 con TNP-OVA (100 μ g) en 2 mg de alumina por ratón intraperitonealmente, y el día 29 con TNP-OVA (50 μ g) en PBS por ratón intraperitonealmente. El suero fue recolectado en los días 0, 14, y 35 para la determinación de los isotipos de Ig anti-TNP, IgM, IgG1 e IgG2a, por la técnica de ELISA convencional.

Los resultados, se muestran en las Figuras 7A-7C, donde los datos se representan como log 10 de los títulos de IgM anti-TNP, IgG1, e IgG2a, respectivamente, indican que el isotipo control, el anticuerpo S5H3 y el anticuerpo mutante DANA.Fc exhiben patrones similares para cada uno de los niveles de isotipo, mientras que la inmunoadhesina CTLA4.Fc actuó de manera diferente. Esto indica que habría poca o ninguna respuesta inmune en un paciente a la administración del anticuerpo S5H3 de la presente especificación .

EJEMPLO 8: El tratamiento con el anticuerpo anti-LT α no afecta la respuesta isotípica de anticuerpos independiente de las células T, lo que indica seguridad

10 Los ratones BALB/c (n = 10/grupo) fueron tratados en el día 0 tanto con anti-ambrosía (isotipo IgG2a de control), como con el anticuerpo de hámster-ratón anti-LT α (S5H3), o con TNFRII.Fc a 6 mg/kg en 100 μ l de PBS intra-peritonealmente. El tratamiento continuó tres veces por semana durante 10 días. Los ratones fueron inmunizados en el día 1 con TNP-FICOLL TM (100 μ g) ip en

15 100 μ l de PBS intraperitonealmente. Los sueros se recogieron en los días 0 y 10 para la determinación de los isotipos de Ig anti-TNP, IgM, IgG1, IgG2a y IgG3 por un ELISA estándar.

En la Figura 8, donde los datos se representan como log 10 de los títulos de, muestra el control de isotipo, el anticuerpo S2C8, y la inmunoadhesina TNFRII.Fc

20 todos se comportaron de manera similar para los isotipos IgM, IgG1, IgG2a e IgG3. Esto demuestra aún más la seguridad de los anticuerpos de la presente especificación para la administración in vivo.

EJEMPLO 9: El anticuerpo anti-LT α evita la enfermedad del injerto contra huésped en SCID humano (GVHD, siglas en ingles)

25 La enfermedad del injerto contra huésped (GVHD) ocurre cuando las células inmunocompetentes son trasplantados en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células T del donante reconocen los antígenos del huésped y se activan, secretan citocinas, proliferan y se diferencian en células efectoras. Esta respuesta se conoce como reacción injerto contra huésped (GVHR). La respuesta

30 GVHR es un síndrome de múltiples órganos, y los efectos pueden variar de una inflamación grave con amenaza para la vida hasta los casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de GVHR en ratones han sido utilizados para el

modelación clínica de los trastornos agudos y crónicos de GVHR que se producen después del trasplante de médula ósea y enfermedades autoinmunes. Un procedimiento general se describe en *Current Protocols in Immunology*, supra, unidad 4.3.

- 5 Los ratones SCID fueron reconstituidos con PBMCs humano purificado con LEUKOPACK™ (disponible en los bancos de sangre, tales como Banco de Sangre Interestatal, Memphis, TN), de un donante normal por gradiente de polisacárido con FICOLL™. Todos los ratones (n = 10/grupo) fueron irradiados a dosis sub-letales con 350 rads utilizando una fuente de Cesio-137. Dos horas
- 10 después de la irradiación, los ratones fueron inyectados con 50 millones de PBMCs humanos /ratón en 200 µl de PBS por vía intravenosa. Inmediatamente después de la inyección de células, los ratones fueron tratados ip ya sea con 300 µg de trastuzumab (anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano), el anticuerpo quimérico 2C8 anti-LTα, o CTLA4-Fc en 100 µl de solución salina dos veces a la
- 15 semana durante tres semanas. POLIMIXINA™ B (110 mg/litro) y la NEOMICINA™ (1,1 g/litro), los antibióticos se añadieron al agua de beber durante los cinco días posteriores a la irradiación. Los ratones fueron monitoreados para la GVHD según lo indicado por la supervivencia.

- Los resultados se muestran en la Figura 9, e indican que en comparación con el
- 20 control de isotipo, el anticuerpo 2C8 incrementó significativamente la supervivencia de los ratones SCID humanos (prevención de GVHD), en comparación el anti-LTα 2C8, la mutante Fc y el control de isotipo, la inmunoadhesina CTLA4.Fc fue la mejor de las moléculas probadas en este modelo. Por lo tanto, los anticuerpos anti-LTα de la presente especificación se
- 25 espera que sea útil en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped. Además, los resultados muestran que el agotamiento de las células LTα positivas es necesario para la eficacia en este modelo, ya que la mutante Fc 2C8 (DANA) no mostró eficacia.

EJEMPLO 10: Los anticuerpos monoclonales anti-LTα se unen a LTα3

- 30 Los pocillos de placas de microtitulación fueron recubiertos con 1 mg/ml de LTα3 humana en 50 mM de solución tampón de carbonato (100 µl/pocillo) durante toda la noche. La solución no absorbida se decanta de los pocillos. Los pocillos fueron

bloqueados con 150 μ L de PBS que contiene 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (PBS-BSA) por 1-2 horas. Se añadió a cada pocillo 100 μ L de la muestra de examen adecuadamente diluida en PBS-BSA (el anticuerpo quimérico anti-LT α 2C8 o 3F12), se incubó durante una hora, y se lavó con PBS que conteniendo
5 0,05% de surfactante Tween TM 20. 100 μ L de una IgG rata anti-ratón marcada con biotina en solución tampón PBS-BSA, se añadió a cada pocillo y se incubó durante una hora. La placa se lava con PBS/0.05% Tween TM -20 surfactante, y la estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) es añadida por 30 minutos a cada pocillo. Cada pocillo se lava con PBS/0.05% surfactante Tween TM -20, y la HRP
10 unida se midió con una solución de tetrametilbenzidina (TMB)/H₂O₂. Después de 15 minutos, la reacción se enfría mediante la adición de 100 μ L de 1M, de ácido fosfórico. La absorbancia a 450 nm se leyó con una referencia de longitud de onda de 650 nm.

La FIG. 10A muestra que los anticuerpos quiméricos anti-LT α 2C8 y 3F12 se unen
15 a LT α 3 humano

Este procedimiento se repitió utilizando LT α 3murino en lugar de LT- α 3 humano y el anticuerpo anti-LT α quimérico ratón-hámster S5H3 y la mutante anti-LT.Fc como el anticuerpo probado para evaluar la capacidad de unión. La FIG. 10B muestra que tanto S5H3 como la mutante anti-LT α .Fc se unen a LT α 3 murino.

20 **EJEMPLO 11: Los anticuerpos anti-LT α se unen a LT α 1 β 2**

Para el ELISA de LT α β , se pocillos de una placa de microtitulación fueron recubiertos con 1 mg/ml de LT α 1 β 2 murino en 50 mM de solución tampón de carbonato (100 μ L/pocillo) durante toda la noche. La solución no absorbida se decanta de los pocillos. Los pocillos fueron bloqueados con 150 μ L de PBS que
25 contiene 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (PBS-BSA) por 1-2 horas. 100 μ L de la muestra de examen adecuadamente diluida (el anticuerpo quimérico anti-LT α S5H3 o la mutante anti-LT α .Fc diluida en PBS-BSA) se añadió a cada pocillo, se incubó durante una hora, y se lavó con PBS que contrenía 0,05% del surfactante Tween 20 TM. 100 μ L de una IgG de rata anti-ratón marcada con biotina en
30 tampón PBS-BSA, se añadió a cada pocillo y se incubó durante una hora. La placa se lava con PBS/0.05% del surfactante Tween 20 TM, y la estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) fue añadida a cada pocillo por 30 minutos. Cada

pocillo se lava con PBS/0.05% de surfactante TWEEN[™] 20, y la HRP unida se midió con una solución de tetrametilbenzidine (TMB)/H₂O₂. Después de 15 minutos, la reacción se enfría mediante la adición de 100 µl de 1M de ácido fosfórico. La absorbancia a 450 nm se leyó con una referencia de longitud de onda de 650 nm.

La FIG. 11A muestra que el anticuerpo quimérico S5H3 anti-LTα unido al complejo murino LTα1β2, al igual que la mutante anti-LT.Fc.

Una prueba por FACS fue el sistema utilizado para determinar la unión de anticuerpos anti-LTα a la LTα en la superficie de las células formando complejo con LTβ. Para la LTαβ humana, las células 293 fueron transfectadas con LTα humana de longitud completa y LTαβ humana (la secuencia de LTα humana Ref. GenBank NM_000595; la secuencia de LTβ humana Ref. GenBank NM_002341) para generar las líneas celulares que expresan establemente la LTαβ humana. Las células fueron incubadas con 1-5 µg/ml de los anticuerpos quiméricos anti-LTα, 3F12 o 2C8, hulgG1.LTβR humana., o el control de isotipo hulgG1 (trastuzumab) durante 20 minutos en PBS con 2% FBS. Las células se lavaron y se incubaron con anti-Ig humana-PE secundaria para la detección de anticuerpos. Para LTαβ murina, las células SVT2 fueron transfectadas con LTα murina de longitud completa y LTαβ murina (la secuencia de LTα murina Ref. GenBank NM_010735; la secuencia de LTβ murina Ref. GenBank NM_008518) para generar las líneas celulares que expresan establemente la LTαβ murina. La LT de superficie se detectó con la quimera hámster-murino S5H3, la mutante anti-LT.S5H3.Fc, la muLTβR.IgG2a, el control de isotipo (anti-IL122 muIgG2a) directamente conjugado con el fluoróforo ALEXA-647[™], durante 20 minutos en PBS con 2% FBS. Las células fueron lavadas, aspiradas y resuspendidas en PBS con 2% FBS. Las células fueron analizadas en un FACSCALIBUR[™] (doble láser) CELLQUEST[™] usando el software, y los resultados analizados en un analizador FLOWJO[™] (Treestar).

La FIG. 11B muestra cómo los anticuerpos quiméricos anti-LTα 3F12 y 2C8 se unieron a la LTA en la superficie de las células humanas formando complejos con LTβ. Ellos se comparan con LTβ-receptor.hulgG1 y el control de isotipo hulgG1 (trastuzumab). Todos los anticuerpos humanos se unieron a la LTα de superficie.

La FIG. 11C muestra cómo el anticuerpo anti-LT α hámster-murino S5H3 se une a la LT α en la superficie de las células murinas formando complejo con LT β . Esta es comparada con el receptor murino LT β IgG2a, la mutante anti-LT S5H3 Fc, el control de isotipo (anti-IL122 mIgG2a). Todos los anticuerpos murinos se unieron a la LT α de superficie.

EJEMPLO 12: Los anticuerpos anti-LT α se unen a las células humanas Th1, Th2 y Th17

Cuando las células T CD4 + maduran en el timo y entran en la periferia del sistema linfático, ellas suelen mantener su fenotipo virgen antes de encontrarse con los antígenos específicos de su receptor de células T (Sprent *et al. Annu Rev Immunol.* 20:551-79 (2002)). La unión a antígenos específicos presentados por las APC, causa la activación de células T. Dependiendo del medio ambiente y la estimulación de citocinas, las células T CD4 + se diferencian en el fenotipo Th1 o Th2 y se convierten en células efectoras o de memoria (Sprent *et al, supra* y Murphy *et al, Nat Rev Immunol.* 2 (12):933-44 (2000)). Este proceso se conoce como activación primaria. Habiendo sido sometidas a la activación primaria, las células T CD4 + se convierten en células efectoras o de memoria, que mantienen su fenotipo como Th1 o Th2. Una vez que estas células se encuentran de nuevo con el antígeno, ellas sufren la activación secundaria, pero esta vez la respuesta al antígeno será más rápida que la primera activación y resulta en la producción de citocinas efectoras determinada por la activación de primaria (Sprent *et al, supra*, y Murphy *et al, supra*).

Las condiciones de activación primaria, células T vírgenes fueron activadas por anti-CD3, anti-CD28, y las citocinas específicas en función de si Th1 o Th2 se estaba examinando. En particular, líneas de células humanas Th1 y Th2 se han generado mediante la estimulación de PBMC humanos con anti-CD3 y anti-CD28 unido a placas (10 μ g/ml y 5 mg/ml, respectivamente; BD Phar Mingen). El día 1, para inducir la diferenciación Th2, interleucina (IL)-4 (5 ng/ml; R & D Systems Inc.), anti-IL-12 (5 μ g/ml, R & D Systems Inc., Minneapolis, MN), y anti-interferón (IFN)-gamma (5 μ g/ml, R & D Systems Inc.) se han añadido. Para la diferenciación de Th1, el día 1, la IL-12 (1 ng/ml; R & D Systems Inc.), IFN-gamma

(10 ng/ml; R & D Systems Inc.), y anti-IL-4 (1 µg/ml, la R + D Systems Inc.) se han añadido. Las células fueron restimulated dos veces en los días 7 y 14.

Para el análisis por FACS de la tinción de la superficie de células para determinar la unión de los anticuerpos para Th1 y Th2 , dos días después del final de la estimulación, las células T humanas activadas (líneas celulares Th1/Th2) fueron incubadas con los anticuerpos anti-LTα 2C8 (1 µg/ml), 3F12 (1 µg/ml), LTβR.Fc (1 µg/ml), TNFRII.Fc (1 µg/ml) o el control de isotipo hulgG1 (1 µg/ml), todos ellos directamente conjugados con el fluoroforo ALEXA FLUOR ® 647 (Invitrogen Corp), durante 20 minutos en PBS con 2% FBS. Las células fueron lavadas, aspiradas, y se volvieron a suspender en PBS con 2% FBS. Las células fueron analizadas en un FACSCALIBUR™ (doble láser) CELLQUEST™ usando el software, y los resultados analizados en un analizador FLOWJO™ (Treestar).

Las FIGs. 12A y 12B muestran que los anticuerpos quiméricos anti-LTα 2C8 y 3F12 se unen a las células humanas Th1 y Th2, respectivamente. Los gráficos también muestran los resultados de la unión de LTβR.Fc, TNFRII.Fc, y el control de isotipo.

Dado que se encontró que LT α3 y LT-α1β2 resultaron ser expresadas en células humanas Th17 así como células Th1 humanas, a través del análisis por FACS, se espera que los anticuerpos contra LTα de la presente especificación , incluyendo los quiméricos 2C8, 2C8.v2, y 2C8. vX (descrito en los ejemplos 3 y 18), que (al igual que Th1 y Th2) se unen a las células humanas Th17 y, por tanto, serán útil en el tratamiento de muchas enfermedades autoinmunes, incluyendo MS (ellos conducen EAE en modelos murinos) y el lupus como así como RA y la IBD, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Por lo tanto, el mismo experimento descrito anteriormente se realizó, excepto para el uso del anticuerpo humanizado anti-LTα 2C8.vX como el anticuerpo LTα y la utilización de una línea celular Th17 así como la línea celular Th1, pero no una línea de células Th2. La línea celular humana Th17 se ha generado mediante la estimulación de PBMC humanos con anti-CD3 y anti-CD28 como se ha señalado anteriormente y con la IL-23 (10 ng/ml; R & D Systems Inc.), anti-IFN-gamma (10 µg/ml , R & D Systems Inc.), y anti-IL-12 (10 µg/ml, R & D Systems Inc.). Este experimento mostró que, de hecho, los anticuerpos 2C8.vX unido a las células

humanas Th17 así como las células Th1 humanas, pero no a las células en reposo. Ver Las FIGs. 12C-E.

EJEMPLO 13: Los anticuerpos contra LT α se unen a las células humanas: T, B y NK A

- 5 Un ensayo por FACS fue el sistema utilizado para determinar la unión de los anticuerpos anti-LT α a la LT α en la superficie de las células humanas primarias. Los PBMC humanos fueron aislados y activados con anti-CD3 y anti-CD28 (10 μ g/ml y 5 μ g /ml, respectivamente; PharMingen BD) durante dos días para activar las células CD4 y CD8; o anti-IgM (10 μ g /ml, R & D Systems Inc.) e IL-4 (20
- 10 ng/ml; R & D Systems Inc.) durante dos días para las células B. Las células NK CD56 + fueron aisladas por selección negativa (Miltenyi Biotec) e incubadas con IL-15 (20 ng/ml; R + D Systems Inc.) durante 15 horas.

- Para el análisis por FACS, las células fueron incubadas con los anticuerpos quiméricos anti-LT α 3F12 (1 μ g/ml), LT β R.hulgG1 humana (1 μ g/ml), o el control
- 15 de isotipo hulgG1 (trastuzumab, 1 μ g/ml), todos ellos directamente conjugados con el fluoróforo ALEXA FLUOR ® 647 (Invitrogen Corp.), durante 20 minutos en PBS con 2% FBS. Las células fueron lavadas, aspiradas, y resuspendidas en PBS con 2% FBS. Las células fueron analizadas en un FACSCALIBUR™ (doble láser) CELLQUEST™ usando el software, y los resultados analizados en un
 - 20 analizador FLOWJO™ (Treestar).

- Las Figuras 13-13E muestran que los anticuerpos se unen a las células, contra el control de isotipo. La Fig. 13A, representa células inactivadas, la Fig. 13B, muestra las células T CD4 activadas por el anti-CD3 y el anti-CD28, la Fig. 13C muestra las células T CD8, la Fig. 13D muestra las células NK CD56 activadas
- 25 por IL15, y la Fig. 13E muestra las células B CD19 activadas por IgM y CD40L.

EJEMPLO 14: Los anticuerpos monoclonales anti-LT α bloquean funcionalmente a LT α 3

1. El bloqueo de LT α 3 humana y murina

- Los pozos de microtitulación fueron recubiertas con 0,7 μ g/ml de TNFRII.hulgG1
- 30 humano (ENBREL®) en 50 mM de solución tampón de carbonato (100 μ l/pocillo) durante toda la noche. La solución que no se absorbió se eliminó por aspiración

de los pocillos. El LTα3 (murinos o humanos) biotinilado fue capturado y detectado con peroxidasa de rábano picante y estreptavidina (HRP). Para la neutralización del LTα3 humano, dosis crecientes de los anticuerpos quiméricos anti-LTα, 2C8 o 3F12 o control de isotipo (trastuzumab) se preincubaron con el

5 LTα3 en las concentraciones indicadas por una hora antes de añadirlos a la microplaca recubierta. El mismo procedimiento se llevó a cabo para la neutralización del LTα3 murino utilizando el anticuerpo quimérico hámster-ratón anti-LTα, S5H3 o la mutante anti-LT.Fc o el control de isotipo (trastuzumab). Cada pocillo fue lavado con PBS/0.05%TWEEN[™] 20 surfactante, y la HRP unida se

10 midió con una solución de tetrametilbenzidina (TMB)/H₂O₂. Después de 15 minutos, la reacción se enfría mediante la adición de 100 µl de 1M de ácido fosfórico a cada pocillo. La absorbancia a 450 nm se leyó con una referencia de longitud de onda de 650 nm.

La FIG. 14A muestra que los anticuerpos anti-LTα, 2C8 y 3F12 bloquearon

15 funcionalmente LTα3 humana frente al control de isotipo. La FIG. 14B muestra que el anticuerpo anti-LTα S5H3 y la mutante anti-LT.Fc bloquearon funcionalmente la LTα3 murina frente al control de isotipo.

2. El bloqueo de la LTα3 inducida por la IL-8 en células A549

La línea de células epiteliales (A549) fue cultivada en presencia de LTα3 durante

20 24 horas. La neutralización del efecto de LTα3 con los anticuerpos quiméricos anti-LTα, 2C8 y 3F12 fue determinada por diluciones seriadas de los anticuerpos anti-LTα (10-0 µg/ml) que se añade a los pocillos adecuados. El sobrenadante se utilizó para detectar IL-8 por un ELISA estándar.

La FIG. 14C muestra que los anticuerpos quiméricos anti-LTα, 2C8 y 3F12

25 bloquearon la LTα3 inducida por la IL-8 en células A549 frente al control de isotipo (trastuzumab IgG1).

3. El bloqueo de LTα3 inducida por la expresión de ICAM en HUVEC

Las células HUVEC fueron cultivadas en presencia de LTα3 durante 24 horas. La neutralización del efecto de LTα3 con los anticuerpos quiméricos anti-LTα, 2C8 y

30 3F12 fue determinada por diluciones seriadas de los anticuerpos anti-LTα (10-0 µg/ml) que se añade a los pocillos adecuados. La expresión de ICAM-I en la

superficie celular fue determinada por FACS, que figura como la media de la intensidad de fluorescencia. El TNFRII.Fc se utilizó como control.

La FIG. 14D muestra que los anticuerpos anti-LT α , 2C8 y 3F12, así como la mutante TNFRII.Fc, bloquearon la expresión de LT α 3 inducida por ICAM en HUVEC frente al control de isotipo (trastuzumab IgG1). El efecto sobre las células no estimuladas también se indica.

4. El bloqueo de LT α 3 inducida por la activación de NF κ B

Para determinar si los anticuerpos anti-LT α bloques la señalización de LT α 3 a través de los receptores del TNF, la línea de células 293 fueron cultivadas en DMEM: F12 50:50 (+ 10% FBS, glutamina, P/S) al 75% de confluencia. Las células fueron transfectadas con un constructo reportero de luciferasa-NF κ B-RE utilizando técnicas de transfección estándar (Fugene). Después de 24 horas, las células se lavaron y, a continuación, se estimularon con LT α 3 (100 ng/ml) o con diluciones seriadas del anticuerpo quimérico anti-LT α , 2C8 (10-0 μ g/ml) que se preincubó con LT α 3 durante 30 minutos. Después de seis horas, las células fueron lavadas con PBS, y se midió la actividad luciferase como sigue: LYSIS BUFFER TM (Promega, 125 μ l/pocillo) se añadió durante 15 minutos. Los lisados fueron recogidos y transferidos a una placa de prueba de 96 pozos (de alta unión, poliestireno blanco, COSTAR TM) a razón de 20 μ l/pocillo en triplicado y leída en un lector de placas LMAXII TM (Molecular Devices) después de la inyección de LUCIFERASE ASSAY REAGENT TM y el STOP AND GLO BUFFERS TM (Promega). El control de isotipo utilizado fue IgG1 trastuzumab.

La FIG. 14S muestra que el anticuerpo anti-LT α 2C8 bloqueó la LT α 3 inducida por la activación de NF κ B, frente al isotipo de control. El efecto sobre las células no estimuladas también se mostró.

EJEMPLO 15: Los anticuerpos anti-LT α bloquean funcionalmente a la LT α 1 β 2

1. El bloqueo de LT α inducida por la activación de NF κ B

Para determinar si el anticuerpo anti-LT α bloquea la señalización de LT α 1 β 2 a través del LT β R, la línea celular 293 fue cultivada en DMEM: F12 50:50 (+ 10% FBS, glutamina, P/S) al 75% de confluencia. Las células fueron transfectadas con un constructo reportero estándar de luciferasa-NF κ B-RE utilizando técnicas

de transfección estándar (Fugene). Después de 24 horas, las células se lavaron y, a continuación, se estimularon con LT α 1 β 2 (R & D Systems Inc.; a 100 ng/ml) o con diluciones seriadas del anticuerpo quimérico anti-LT α , 2C8 (10-0 μ g/ml) que se preincubó con LT α β durante 30 minutos. Después de seis horas, las células
5 fueron lavadas con PBS, y la actividad luciferase se midió de la siguiente manera: LYSIS BUFFER TM (Promega, 125 μ l/pocillo) se añadió durante 15 minutos. Los lisados fueron recogidos y transferidos a una placa de prueba de 96 pozos (de alta union, poliestireno blanco, COSTAR TM) a razón de 20 μ l/pocillo en triplicado y leída en un lector de placas LMAXII TM (Molecular Devices) después de la
10 inyección de LUCIFERASE ASSAY REAGENT TM y el STOP AND GLO BUFFERS TM (Promega). El control de isotipo utilizado fue IgG1 trastuzumab.

La FIG.15A muestra que el anticuerpo anti-LT α 2C8 bloqueó funcionalmente la LT α 1 β 2 inducida por la activación de NF κ B, frente al isotipo de control. La respuesta de las células no estimuladas también se muestra.

15 2. El bloqueo de la citotoxicidad inducida por LT α 3-, LT α 2 β 1-, y LT α 1 β 2

Las muestras fueron ensayadas para la capacidad de neutralizar la actividad citolítica de LT α 3, LT α 2 β 1, y LT α 1 β 2 (R & D Systems Inc.) en un ensayo de citotoxicidad con L929 murinas. Las células L929 fueron cultivadas en placas de microtitulación en presencia de uno de los tres reactivos LT α (a las dosis
20 indicadas en las figs. 15B-D) y el inhibidor de ADN el actinomycin-D. El anticuerpo quimérico neutralizantes anti-LT α , 2C8 se añadió a los cultivos en 10 μ g/ml. La lisis celular fue determinada por la tinción estándar de células viables ALAMARBLUE TM y representada como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

25 Las FIGs. 15B, 15C, 15D y muestran que el anticuerpo quimérico anti-LT α , 2C8 bloqueó, la citotoxicidad inducida por LT α 3-, LT α 2 β 1-, y LT α 1 β 2 respectivamente.

3. El bloqueo de la expresión de ICAM inducida por LT α 1 β 2 en HUVEC

Las células HUVEC fueron cultivadas en presencia de LT α 1 β 2 (R & D Systems Inc.) por 24 horas. La neutralización de los efectos de LT α 1 β 2 con los anticuerpos
30 anti-LT α fue determinada por diluciones seriadas de los anticuerpos quiméricos

anti-LT α , 2C8 y 3F12 (10-0 μ g/ml) que se añaden a los pocillos. La expresión de ICAM-I en la superficie celular fue determinada por FACS.

La FIG. 15E muestra que los anticuerpos quimérico anti-LT α , 2C8 y 3F12 bloquearon la expresión de ICAM inducida por LT α 1 β 2 en HUVEC, frente al control de isotipo (trastuzumab IgG1). El efecto sobre las células no estimuladas también se muestra.

EJEMPLO 16: El anticuerpo monoclonal anti-LT α puede matar las células que expresan LT α β .

Se realizó un ensayo ADCC en una placa de microtitulación por duplicado de la siguiente manera. Se aislaron las células NK de 100 ml de sangre total de un donante humano normal mediante la selección negativa (ROSETTESEP TM, # 15065, StemCell Technologies). El diluyente fue RPMI TM 1640 y 0,25 mg/ml de BSA. El anticuerpo quimérico 2C8 y la mutante Fc del mismo, en una dilución seriada a partir de 100 nm en 50 μ l, se incubaron con 50 μ l de las células 293 que expresan establemente LT α β humanos (20,000) (véase el Ejemplo 11 para más detalles) durante 30 minutos a temperatura ambiente. se agregaron 50 μ l de células NK (120,000) y se incubaron por un período adicional de cuatro horas a 37 ° C. Las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, y 100 μ l de sobrenadante fue transferido a una placa de 96 pozos de fondo plano. El nivel de la lisis celular fue determinada mediante la medición de la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH kit, # 1-644-793, Roche) liberado de las células lisadas. 100 μ l de mezcla de reacción del kit LDH se añadió a 100 μ l de sobrenadante y se incubó durante un máximo de 30 minutos. Las placas se leyeron a 490 nm. Los controles incluyeron dianas: células efectoras en la ausencia de anticuerpos (para lisis independiente de anticuerpos), las células diana solo con el 1% Triton X-100 TM surfactante (para la lisis total) y de anticuerpos controles positivos y negativos de ADCC.

La FIG. 16 muestra que el anticuerpo anti-LT α , 2C8 lisó en el ensayo de ADCC una línea celular 293 que expresa LT α β humana, pero el correspondiente anticuerpo monoclonal mutanteFc no lo hizo.

EJEMPLO 17: El anticuerpo monoclonal anti-LT α bloquea la secreción de citocinas y quemocinas en las células 3T3 y HUVEC

Las células 3T3 y HUVEC fueron cultivadas en presencia de LT α 3 humana (100 ng/ml; R & D Systems Inc.), o LT α 1 β 2 humana (200 ng/ml, R & D Systems Inc.)
5 por 24 horas usando reactivos humanos o murinos, respectivamente. La neutralización de los efectos de los trímeros LT α con los anticuerpos quiméricos anti-LTA, 2C8 o S5H3 (el quimérico 2C8 con HUVEC, el quimérico ratón y hámster S5H3 con células murinas 3T3) se determinó utilizando una dosis de 10-
10 0 μ g/ml. Los sobrenadantes fueron ensayados para la RANTES humana, la IL-6, IP-10 e IL-8 para la evaluación en HUVEC, o RANTES murino, IL-6, IP-10, y KC para la evaluación en 3T3, utilizando el juego de reactivos estándar LINCOPLEXTM y leyendo en un lector de placas LuminexTM.

Las FIGs. 17A-H muestran que el anticuerpo anti-LT α , frente a un control de isotipo y en comparación con las células no estimuladas, bloquearon la secreción
15 de citocinas y quemocinas en células HUVEC, con las figuras 17A-17D, respectivamente, mostrando KC/IL-8, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 1 β 2, y las figuras 17E-17H, respectivamente, mostrando KC/IL-8, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 3.

Las FIGs. 17I-P muestran que el anticuerpo anti-LT α , frente a un control de isotipo
20 y en comparación con las células no estimuladas, bloqueó la secreción de citocinas y quemocinas en las células 3T3, con figuras 17I-17L, respectivamente, mostrando KC, RANTES, IP10, e IL-6 con LT α 1 β 2, y las figuras 17M-17P, respectivamente, mostrando KC, RANTES, IP 10, e IL-6 con LT α 3.

Resumiendo, los anticuerpos preferidos anti-LT α de la presente especificación:

- 25 1) Bloquean LT α 3
- 2) Agotan las células LT α positivas mediante la unión a LT α como diana, la cual forma un complejo con LT β en la superficie de la célula. Los datos de que el agotamiento es importante son los datos *in vivo* comparando el tipo salvaje con la mutante Fc (DANA) para ratón: la CIA, AIA (Figs. 4 y 5); para humanos:
30 ratones SCID humanos con 2C8 (fig. 9) y el ensayo ADCC (Fig. 16)
- 3) Bloquean la función de LT α β

- 4) Se dirigen a cualquier célula que exprese LT α , incluyendo enfermedades impulsadas por T, B y, posiblemente, o probablemente cualquier Th1 o Th17 o Th2 (y células NK), aunque no se limita a una teoría.

Las enfermedades que se espera que tengan beneficio del tratamiento con los anticuerpos de la presente especificación incluyen la RA, IBD, psoriasis, MS, el síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, miastenia gravis y lupus, especialmente, RA, MS, lupus (por ejemplo, SLE y LN), e IBD, incluyendo la enfermedad de Crohn y la UC.

EJEMPLO 18: El anticuerpo anti-LT α , 2C8.vX de afinidad madurada

- 10 La maduración de afinidad del anticuerpo 2C8 se señala en el Ejemplo 3 condujo al anticuerpo humanizado 2C8.vX. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada y las CDRs de este anticuerpo se muestran en las figuras 18A y 18B, respectivamente, junto con el CDRs.

La siguiente es la secuencia de ADN que codifica toda la cadena pesada de
15 longitud completa del anti-LT α 2C8.vX:

GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTC
CGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTATGTGATCCATTGGGT
CCGTCAGGCCCCGGGTAAGGGCCTCGAGTGGGTTGGTTATAACAATCCTTATAAC
GCCGGCACCAACTATAACGAGAAGTTCAAGGGGCGCTTCACTATCAGTTCTGAC
AAGTCGAAAAACACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACT
GCCGTCTATTATTGTCTCGACCCACAATGCTCCCATGGTTCGCCTACTGGGGTCA
AGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTAC

CGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAA
CCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGAATCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGACAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
(SEQ ID NO:104)

La siguiente es la secuencia de ADN que codifica toda la cadena ligera de longitud completa del anti-LTα 2C8.vX:

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCTCTGTGGGCGATAGGG
TCACCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGGCTGTGTCTTCCGCTGTAGCCTGGTATCA
ACAGAAAACAGGAAAAAGCTCCGAAAGTACTGATTTACTCTGCATCCCACCGTTAC
ACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGATCTGGGACGGATTTCACCTCTGAC
CATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTGAGGAATCTTAT
TCTACTCCTTGGACGTTCCGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTG
GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:105)

La siguiente es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de para 2C8.vX:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNYN
AGTNYNEKFKGRFTISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFA YWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSI,TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:106)

La siguiente es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa para 2C8.vX:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQESYSTPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:107)

El mapeo des epítopo indica que esta molécula tiene una superposición parcial con el sitio de unión del receptor. Las células T y B de Rhesus activadas expresan LTαβ de superficie. El anticuerpo 2C8.vX se unió (reaccionó de forma cruzada) con el LTαβ de rhesus de superficie (según determinado por FACS) y el LTα3 de hesus soluble (según se determino por FORTEBIO TM octeto).

Las FIGs. 19A y 19B muestran, respectivamente, los ELISAs de LTα3 y LTα1β2 de unión a los anticuerpos 2C8.vX comparación con el control de isotipo/TNFRII.Fc. Estos ELISA se han realizado de la misma manera como se describe en el Ejemplo 10 supra utilizando LTα3 humana y en el ejemplo 11 utilizando LTα1β2. Los valores de EC₅₀ de estos mismos anticuerpos a LTα3 y LTα1β2 son de 1,03 nM para el TNFRII.Fc y 0,05 nM para 2C8.vX para la LTα3, y no de unión a TNFRII.Fc y 0,34 nM para 2C8.vX para LTα1β2. Los resultados muestran que 2C8.vX se unio mucho mejor que TNFRII.Fc en ambos casos.

Las FIGs. 20A y 20B presentan, respectivamente, el bloqueo de los LTα3 y LTα1β2 por los anticuerpos 2C8vX en comparación con el control de isotipo/TNFRII.Fc utilizando el ensayo para la prueba de bloqueo de la

citotoxicidad inducida por LT humana descrita en el Ejemplo 15. Los valores de IC_{50} estos mismos anticuerpos para $LT\alpha 3$ y $LT\alpha 1\beta 2$ son de 0,83 nM TNFRII.Fc y 0,29 nM para 2C8.vX para $LT\alpha 3$, sin bloqueo de isotipo, y 0,31 nM para 2C8.vX para $LT\alpha 1\beta 2$, sin bloqueo de isotipo. Los resultados muestran que 2C8.vX
5 bloqueó $LT\alpha 3$ mejor que TNFRII.Fc.

La FIG. 21 se refiere a un ensayo que muestra la inhibición funcional de ICAM1 regulado hacia arriba por $LT\alpha 3$ en las células HUVEC, utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 14. La FIG. 21 muestra una comparación de cómo las diferentes moléculas bloquearon $LT\alpha 3$ en este ensayo funcional. En concreto, el
10 control de isotipo, el 2C8.vX, y el TNFRII.Fc fueron comparados. Los resultados muestran que ambos anticuerpos fueron capaces de bloquear $LT\alpha 3$ en este ensayo.

La FIG. 22 se refiere a un ensayo que muestra el bloqueo funcional de $LT\alpha 1\beta 2$ usando células 293- $LT\beta R$, utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 15. La
15 FIG. 22 muestra una comparación de cómo las diferentes moléculas bloquean $LT\alpha 1\beta 2$ en este ensayo funcional. En concreto, el control de isotipo y 2C8.vX se compararon junto con las células no estimuladas. Los resultados muestran que 2C8.vX pudo bloquear $LT\alpha 1\beta 2$ en este ensayo, con un IC_{50} de aproximadamente 5 nM.

20 La FIG. 23 muestra la actividad ADCC de 2C8.vX utilizando el protocolo establecido en el Ejemplo 16 la participación de las células 293- $LT\alpha 1\beta 2$. El 2C8.vX se comparó con la mutante 2C8.vX DANA y el control de isotipo. Los resultados muestran que 2C8.vX tuvo actividad ADCC, mientras que la mutante DANA no.

25 La FIG. 24 muestra los resultados de supervivencia con HVHD con el 2C8.vX y CTLA4-Fc, en comparación con los controles (mutante Fc y control de isotipo) en un modelo SCID humano, utilizando el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente en el ejemplo 9, que termina de tres a cuatro semanas. Los resultados indican que CTLA4-Fc y 2C8.vX prolongaron la supervivencia en este
30 modelo, y, por tanto, son eficaces en el agotamiento de las células $LT\alpha$, pero no los controles 2C8.vX- mutantes DANA y control de isotipo de anticuerpos IgG1humana.

Las FIGs. 25A-D muestran que el anticuerpo 2C8.vX depletó las células T y B expresando la LT α 1 β 2 en el modelo GVHD SCID humano. En este protocolo, los ratones SCID se reconstituyen con PBMCs purificado de una LEUKOPACK™ (disponible en los bancos de sangre, tales como Banco de Sangre Interestatal, 5 Memphis, TN), de un donante normal mediante un gradiente polisacárido con FICOLL™. Todos los ratones (n = 10/grupo) fueron irradiados subletalmente con 350 rads utilizando una fuente de Cesio-137.

Dos horas después de la irradiación, los ratones fueron inyectados con 50 millones de PBMCs humanos/ratón en 200 μ l de PBS intrasplenicamente. Un día 10 después de la inyección de células, los ratones fueron tratados ip ya sea con 300 μ g del anticuerpo control de isotipo IgG1 humana, el 2C8.vX, o la mutante 2C8.vX DANA en 100 μ l de solución salina por un día. El día 2 después de la irradiación, los esplenocitos de los ratones fueron marcados con 5- (y 6-) carboxi fluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE), y, el número de células absolutas (CFSE total 15 de células positivas) se midió y el porcentaje de células en los picos CFSE se midió después de conmutar electrónicamente en las células CD4+, CD8+ y CD19+. Para esta tinción de tres colores, los siguientes anticuerpos monoclonales fueron utilizados: PE-marcado con anti-CD4, PE marcado con anti-CD8, y PE marcado con CD19. Las células teñidas se analizaron en un FACSCAN™ o el 20 instrumento FACSCALIBUR™.

Los resultados en la FIG. 25A muestran el total de las células humanas positivas para CFSE en el día 2, para el control de isotipo, el 2C8.vX, y la mutante 2C8.vX.DANA, e indican que el agotamiento fue mejor con el anticuerpo vX. Las FIGs. 25B-D muestran los resultados de conmutar el uso de células CD4, CD8, 25 CD 19 y los anticuerpos, respectivamente, indicando que el anticuerpo vX fue mejor en el agotamiento de las células T y B positivas para LT α β en comparación con el control de isotipo y la mutante DANA.

En resumen, el anticuerpo 2C8.vX agota células que expresan LT en un ensayo de ADCC *in vitro* e *in vivo* en dos modelos humanos SCID de GVHD. También 30 bloquea LT α 3 y LT α 1 β 2 en ensayos de células funcionales utilizando las células HUVEC y las células 293-LT β R, respectivamente. Además, tiene reacción

cruzada con linfotoxina de primates no humanos (NHP) como se determinó por las células primarias de rhesus activadas y la proteína de rhesus LTα3.

EJEMPLO 19: El anticuerpo anti- LTα de afinidad madurada, 3F12.vI4

La maduración de afinidad del anticuerpo 3F1 2 que se ha señalado anteriormente
5 condujo al anticuerpo humanizado 3F12.vI4.

Las regiones variable de cadena pesada y la cadena ligera y de las CDRs de este anticuerpo se muestran en las figuras 26A y 26B, respectivamente, junto con las CDR.

Cuando se evaluo la unión y el bloqueo de LTα3 y Ltαβ utilizando los ensayos
10 señalados anteriormente, el 3F12.vI4 se unió y bloqueó estas moléculas así como lo hizo al igual que de anticuerpos 2c8.vX.

EJEMPLO 20: El 2C8.vX afucosilado

Los anticuerpos en la presente especificación pueden ser modificados de forma tal que ellos pierden la fucosa mediante el cultivo utilizando una línea celular o la
15 tecnología divulgada en US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614, 2002/0164328 US, US 2004/0093621; US 2004/0132140, 2004/0110704 US; US 2004/0110282, 2004/0109865 US; WO 2003/085119, WO 2003/084570, WO 2005/035586, WO 2005/035778; WO2005/053742; US 2006/0063254 ; US 2006/0064781, 2006/0078990 US; US 2006/0078991;
20 Okazaki y otros MDI Biol. J. 336: 1239 - 1249 (2004), o Yamane-Ohnuki y otros. Biotecnología. Bioeng. 87: 614-622 (2004). Ejemplos de líneas de células productoras de anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec 13 deficientes en la fucosilacion de proteínas (Ripka y otros, Arco. Biochem. Biophys., 249:533-545 (1986); 2003/0157108 Al US (Presta) y WO 2004/056312
25 Al (Adams y otros, especialmente en Ejemplo 11), y líneas celulares con el apagamiento de algunos genes, como el gen para la alfa-1,6-fucosiltransferase, FUT8, las células CHO noqueadas (Yamane-Ohnuki *et al supra*).

De hecho, el anticuerpo 2C8.vX fue afucosilado para producir un anticuerpo llamado anti-LTa2C8.vX AF. Esta molécula se ha generado utilizando una línea
30 celular CHO estable con el apagamiento de genes FUT8 por el método descrito en Yamane-Ohnuki *et al, supra*. Este es 100% afucosilado.

Las propiedades biofísicas de la 2C8.vX (incluyendo los datos de bloqueo y de unión) no fueron sustancialmente modificados después de la afucosilación del mismo, a excepción de la ADCC. Las propiedades de ADCC del tipo salvaje y las moléculas afucosiladas se determinó mediante la realización de los experimentos con el protocolo establecido en el Ejemplo 16 con la participación de las células 293-LT α 1 β 2. Los resultados se muestran en la fig. 27. La figura muestra que el anticuerpo afucosilado anti-LTa 2C8.vX AF tiene aproximadamente un incremento de diez veces sobre el de los anticuerpos de tipo salvaje (WT) (producidos en una línea de células CHO normal como se ha descrito anteriormente).

10 EJEMPLO 21: El 2C8.vX con baja fucosilación

Como una forma alternativa para lograr altos rendimientos de anticuerpos no fucosilados en células de mamífero, puede ser empleado un enfoque de RNAi para noquear la expresión de los genes FUT8. Un plásmido puede ser utilizado para producir una horquilla corta siRNA que consta de la secuencia de siRNA sentido de 19nt (nucleótido) específica para el gen FUT8, unida a su secuencia de siRNA antisentido inversa complementaria mediante un espaciador corto (lazo de la horquilla de 9nt), seguido por 5-6 Us en el 3' final.

Fueron diseñadas cuatro sondas diferentes de RNAi para elegir como blanco las diferentes regiones sobre la base de la disponibilidad de la secuencia del ADN de CHO FUT8.

Para comprobar la eficacia de estas sondas RNAi, se construyó una bandera-etiquetada con la proteína de fusión FUT8 utilizando las secuencias de ADN disponibles de FUT8 de CHO (Genbank accesión no. P_AAC63891). La RT-PCR se realiza con cebadores FUT8 y el fragmento resultante de PCR fundido con la etiqueta de secuencia de BANDERA en 5'. El fragmento etiquetado FUT8 es clonado en un vector de expresión. El plásmido con la sonda de RNAi y el plásmido con la bandera-etiquetada FUT8 son cotransfectados en células CHO. El lisado de células se extrajo 24 horas después de la transfección y el nivel de la proteína de fusión FUT8 fue analizado usando el anticuerpo anti-bandera M2 por inmunoelectrotransferencia. En presencia de sondas de RNAi, se espera que la expresión de proteínas de fusión se inhiba significativamente en la mayoría de los casos.

- Las dos sondas que muestran el mejor efecto inhibidor son transfectadas en una línea de células CHO que expresa un anticuerpo que se describe en la presente especificación, como el 2C8.vX. El anticuerpo anti-LT α expresado, es purificado por una columna de proteína A y sometida la técnica MALDITOF (de las siglas en
- 5 ingles, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) desorción/ionización mediante láser asistida por matriz MALDI, asociada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF), para el análisis de espectros de masa, de los oligosacáridos unidos a la asparagina (incluyendo el contenido fucosa) y el ensayo de unión de Fc γ R como se describe a continuación.
- 10 Los métodos para el análisis de los oligosacáridos por MALDI-TOF se realizan generalmente de la siguiente manera: los oligosacáridos N-enlazados son liberados de las glicoproteínas recombinantes utilizando el péptido-N-glicosidasa-F (PNGase F) descrito en Papac *et al*, *Glycobiology* 8, 445-454 (1998) Brevemente, el pocillos de una placa de microtitulación de difluoruro de
- 15 polivinilideno (PVDF) de 96-pocillos alineados (Millipore, Bedford, MA) son condicionados con 100 μ l de metanol que se extrae a través de las membranas de PVDF mediante la aplicación de vacío con el manifold multipantalla de Millipore TM (MILLIPORETM multiscreen vacuum manifold). Las membranas de PVDF acondicionadas se lavan con 3 x 250 μ l de agua. Entre todos los pasos de lavado
- 20 los Pocillos son drenado completamente mediante la aplicación de vacío suave con el equipo manifold. Las membranas se lavan con la solución tampón para la reducción y la carboximetilación (MCR) que consta de 6 M hidrocloreuro de guanidina, 360 mM de solución tampón Tris, 2 mM EDTA, pH 8.6. Las muestras de glicoproteína (50 μ g) se aplican a los Pocillos, se extraen de nuevo a través de
- 25 la membrana de PVDF mediante el vacío suave y los pocillos se lavan con 2 X 50 μ l de la solución tampón MCR. Las muestras inmovilizadas se reducen mediante la adición de 50 μ l de la solución de 0,1 M ditioneitol (DTT) a cada pocillo y la placa de microtitulación se incuba a 37. ° C durante 1 hora. El DTT se elimina al vacío y se lavan los Pocillos con 4 x 250 μ l de agua. Los residuos de cisteína son
- 30 carboximetilatados mediante la adición de 50 μ l de la solución de 0,1 M de ácido iodoacético (IAA) recién preparada en 1 M de NaOH y se diluye a 0,1 M con la solución tampón MCR.

La carboximetilación se logra mediante incubación durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. El vacío se aplica a la placa para eliminar la solución de IAA y el Pocillos se lavan con 4 x 250 µl agua purificada. Las membranas de PVDF son bloqueados por la adición de la solución de 100 µl de 5 1% PVP360 TM (polivinilpirrolidina 360.000 MW) (Sigma) e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El PVP-360 TM solución se elimina por vacío suave y se lavan los Pocillos 4 x 250 µl de agua. El péptido: N-Glicosidasa F (PNGase F TM) amidase (New England Biolabs, Beverly, MA), se añade a cada pocillo a 25 µl de una solución a de 25 unidades /ml en 10 mM de Tris acetato, pH 10 8.3, y la digestión del producto ocurre durante 3 horas a 37 ° C. Después de la digestión, las muestras se transfieren a tubos Eppendorf de 500 µl TM y se añaden a cada muestra 2,5 µl de una solución 1,5 M de ácido acético. Las muestras acidificadas son incubadas durante dos horas a temperatura ambiente para convertir a los oligosacáridos de la glicosilamine a la forma hidroxilo. Antes del 15 análisis del espectro de masas por MALDI-TOF, los oligosacáridos son liberados mediante un desalado usando 0,7 ml de lecho de un intercambiador de cationes (AG50W-X8 resina en forma de hidrógeno) (Bio-Rad, Hercules, CA) el compuesto acuoso se envasa en tubos de reacción compactos (US Bioquímicas, Cleveland, OH).

20 Para el análisis de espectro de masa por MALDI-TOF, de las muestras positivas, los oligosacáridos desalados (alícuotas de 0,5 µl) se aplican a los blancos de acero inoxidable con 0,5 µl de la matriz de ácido 2,5 dihidroxibenzoico (sDHB) que se prepara disolviendo 2 mg 2,5 de ácido dihidroxibenzoic con 0,1 mg de ácido 5-metoxisilicico en 1 ml de 1 mM de NaCl en etanol acuoso al 25%. La mezcla de 25 muestra/matriz se seca al vacío y, a continuación, se le permite absorber la humedad atmosférica antes del análisis. Los oligosacáridos liberados son analizados por MALDI-TOF en un espectrómetro de masa PERSEPTIVE BIOSYSTEMS VOYAGER-ELITE TM. El espectrómetro de masa, es operado en el modo positivo a 20 kV con la configuración lineal y la utilización de retraso en la 30 extracción. Los datos son adquiridos mediante una potencia de láser de aproximadamente 1100 y en el modo de resumen de datos (240 exploraciones) para mejorar la relación señal/ruido. El instrumento está calibrado con una mezcla de oligosacáridos estándar y los datos se suavizan mediante un algoritmo 19-

punto Savitsky-Golay antes de que las masas sean asignadas. La integración de los datos del espectro de masa se consigue utilizando el paquete de software de análisis de datos CAESAR 7.2 TM (software SciBridge).

La unión del control y la prueba de materiales para los receptores humanos Fcγ
5 pueden ser evaluados usando versiones modificadas de los procedimientos
descritos originalmente por Shields *et al*, *J Biol Chem*, 276:6591-604 (2001).

Para la confirmación de que las células transfectadas con el RNAi tienen efectivamente una menor expresión de FUT8, se puede realizar una transferencia (de tipo) Northern utilizando las muestras de ARN extraído de las células transfectadas 24 horas después de la transfección. El ARN total de células que contienen un plásmido de control (secuencia aleatoria de ADN de ratón, que no tiene homología con las proteínas de ratón conocidas) y dos plásmidos RNAi pueden ser purificados e hibridados con una sonda de 300 pb. La eliminación del ARN de la α 1,6 - fucosiltransferasa endógena puede ser confirmada por PCR cuantitativa.

Depósito del material

Los siguientes materiales han sido depositados en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd..., Manassas, VA 20110-2209, US (ATCC):

Material

ATCC N °. Depósito, Fecha de Depósito

20 hibridoma murino Linfotoxina alfa2 beta1 s5H3.2.2 PTA-7538 19 de abril de 2006 .

Este depósito ha sido realizado en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en materia de Patentes y su Reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible por ATCC en los términos del Tratado de Budapest, y con sujeción a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de los descendientes del cultivo de los depósitos al público a la emisión de la patente pertinente de los US o en el momento en que se declare abierta al público de cualquier solicitud de patente de US o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie

a alguien determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas de US de tener derecho a ella de acuerdo a 35 USC § 122 y el Comisionado de las normas en virtud de los mismos (incluido el 37 CFR § 1.14, con especial referencia a 886 OG 638).

- 5 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito debe morir o se pierde o es destruido, cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se sustituirán con otro de la misma con la notificación inmediata. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención, en contravención
- 10 de los derechos concedidos en virtud de la autoridad de cualquier gobierno, de conformidad con sus leyes de patentes.

- La anterior descripción escrita se considera suficiente para que un experto en la materia pueda llevar a la práctica la invención. La presente invención no debe ser limitada en su alcance por los ejemplos presentados en la presente
- 15 especificación. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las divulgadas y descritos en la presente especificación serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran en el alcance de las reivindicaciones que se adjuntan.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α) aislado que comprende al menos una secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada a partir del grupo que consiste de:
- (a) una secuencia CDR-1 que comprende los aminoácidos de A1-A11, donde A1-A11 es KASQAVSSAVA (ID SEC NO: 1) o RASQAVSSA VA (ID SEC NO: 2), o comprende los aminoácidos A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYSTNQKNFLA (ID SEC NO: 3) o KSSQSLLYSANQKNFLA (ID SEC NO: 4) o KSSQSLLYSTNQKNALA (ID SEC NO: 6), donde N es cualquier aminoácido;
- (b) una secuencia CDR-L2 que comprende los aminoácidos B1-B7, donde B1-B7 es SASHRYT (ID SEC NO: 7) o WASTRDS (ID SEC NO: 8);
- (c) una secuencia CDR-L3 que comprende los aminoácidos C1-C9, donde C1-C9 es QQHYSTPWT (ID SEC NO: 9) o QENYSTPWT (ID SEC NO: 11) o QQYYSYPRT (ID SEC NO: 13) o QQYASYPRT (ID SEC NO: 14) o QQYYAYPRT (ID SEC NO: 15), donde N es cualquier aminoácido;
- (d) una secuencia CDR-H1 que comprende los aminoácidos D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYVIH (ID SEC NO: 16) o GYTFSSYWIE (ID SEC NO: 17),
- (e) una secuencia CDR-H2 que comprende los aminoácidos E1-E17, donde E1-E17 es YNNPYNDGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 18) o EISPGSGSTNYNEEFKG (ID SEC NO: 19) o YNNPYNAGTNYNEKFKG (ID SEC NO: 101) o EINPGSGSTIYNEKFKG (ID SEC NO: 110), donde N es cualquier aminoácido, y
- (f) una secuencia CDR-H3 que comprende los aminoácidos F1-F9, donde F1-F9 es PTMLPWFAY (ID SEC NO: 20), o comprende los aminoácidos F1-F5, donde F1-F5 es GYHGY (ID SEC NO: 21) o GYHGA (ID SEC NO: 22).
2. El anticuerpo para la reivindicación 1, donde la ID SEC NO: 3 es KSSQSLLYSTAQNFLA (ID SEC NO: 5).

- 3. El anticuerpo para la reivindicación 1 ó 2, donde ID SEC NO: 11 es QESYSTPWT (ID SEC NO: 10) o QEVYSTPWT (ID SEC NO: 12).
- 4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la secuencia CDR-L1 es la ID SEC NO: 2 ó 3 ó 4 ó 6.
- 5 5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende ya bien todas las ID SEC NOS: que 1 ó 2 y 7 y 9, o la totalidad de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 u 8 y 11, o la totalidad de las ID SEC NOS: 16, 18, y 20, o la totalidad de las ID SEC NOS: 16, 101, y 20.
- 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende ya bien
10 todas las ID SEC NOS: 3, 8, y 13, o la totalidad de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 13, o la totalidad de las ID SEC NOS : 3, 8, y 14 ó 15, o la totalidad de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 14 ó 15, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 19, y 21 ó 22, o la totalidad de las ID SEC NOS: 17, 110 , y 21.
- 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende (i) todas
15 las secuencias de aminoácidos de CDR-L1 a CDR-L3 de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 y 9, o de las ID SEC NOS: 1 ó 2 y 7 u 8 y 11, o de las ID SEC NOS: 3, 8, y 13, o de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 13, o de las ID SEC NOS: 3, 8, y 14 ó 15, o de las ID SEC NOS: 4, 5 ó 6, 8, y 14 ó 15, y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR-H1 a CDR-H3 de las ID SEC NOS: 16, 18 y 20 , o de las ID SEC NOS:
20 16, 101, y 20, o de las ID SEC NOS: 17, 19, y 21 ó 22, o de las ID SEC NOS: 17, 110, y 21.
- 8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende una secuencia del marco consenso del subgrupo 1 κ humano.
- 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende una
25 secuencia del marco consenso del subgrupo III humano de la cadena pesada.
- 10. El anticuerpo para la reivindicación 9, donde la secuencia del marco de comprende una sustitución en la posición 71, 73, ó 78.
- 11. El anticuerpo para la reivindicación 10, donde dicha sustitución es R71A, N73T, o N78A o una combinación de las mismas.

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que se une a la linfotóxina- α 3 trimérica (LT α 3) y bloquea la interacción de la LT α 3 con el receptor del factor de necrosis tumoral-I (TNFRI) y del receptor del factor de necrosis tumoral-II (TNFRII).
- 5 13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que se une a un complejo heterodimérico linfotóxina- $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$).
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que bloquea la función LT $\alpha\beta$.
15. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que tiene una región
10 Fc, y disminuye los niveles de citocinas inflamatorias asociadas a la artritis reumatoide en un ensayo de artritis *in vitro*.
16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 10-15, que bloquea la interacción de LT $\alpha\beta$ con el receptor de la linfotóxina-beta (LT β -R).
17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que depleta las
15 células LT α positivas.
18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que modula las células que expresan LT $\alpha\beta$.
19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que es quimérico o humanizado.
- 20 20. El anticuerpo para la reivindicación 19, que es humanizado.
21. El anticuerpo para la reivindicación 20, donde al menos una porción de su secuencia del marco es una secuencia del marco conceso humana.
22. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones que 1-21, donde dicho anticuerpo se une a LT α con una afinidad de al menos 10^{-12} M.
- 25 23. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que es del isotipo IgG.
24. El anticuerpo para la reivindicación 23, donde la IgG es IgG1 o IgG2a.
25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 15-24, donde la región Fc es una región Fc tipo salvaje.

26. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 15-24, que además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en su región Fc, la cual resulta que en que tenga incrementada la función de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en comparación con el mismo anticuerpo que tiene la región Fc de secuencia nativa.
27. El anticuerpo para la reivindicación 26, que además comprende de una a tres sustituciones de aminoácidos en su región Fc.
28. El anticuerpo para la reivindicación el 26, donde la región Fc tiene las sustituciones de aminoácidos en cualquiera o en cualquier combinación de las posiciones que son 268D, o 298A, o 326D, o 333A, o 334A o 298A junto con 333A, o 298A junto con 333A, , o 298A junto con 334A o 239D junto con 332E, o 239D junto con 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332A, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 330L y 332E y 272Y y 254T y 256E, o 250Q junto con 428L, o 265 A, o 297A, donde la sustitución 265A es en ausencia de 297A y la sustitución 297A es en ausencia de 265A.
29. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 20-28, que tiene una afinidad monovalente para la LT α que es aproximadamente igual o superior a la afinidad monovalente para la Lt α humana de un anticuerpo murino producido por una línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el Número de Acceso PTA -7538 (hibridoma murino Linfotoxina alfa2 beta1 s5H3.2.2).
30. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, donde la afinidad monovalente se expresa como un valor de Kd.
31. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 30, donde la afinidad monovalente se mide mediante un biosensor óptico o por radioinmunoensayo.
32. Un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α), que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 23 ó 24, o un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 25 ó 26, o que tiene los dominios

variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden ambas ID SEC NOS: 23 y 25 o que comprende ambas ID SEC NOS: 24 y 26.

33. Un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α), que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 27 ó 28, o un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 29 ó 30 ó 31, o que tiene los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden ambas ID SEC NOS: 27 y 29, o que comprende ambas ID SEC NOS: 27 y 30, o que comprende ambas ID SEC NOS: 27 y 31, o que comprende ambas ID SEC NOS: 28 y 30, o que comprende ambas ID SEC NOS: 28 y 31.
34. Un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α), que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 102, o un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 103, o que tiene los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden ambas ID SEC NOS: 102 y 103.
35. Un anticuerpo anti-linfotoxina- α (LT α), que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende la ID SEC NO: 108, un dominio variable de la cadena pesada que comprende la ID SEC NO: 109, o que tiene los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden ambas ID SEC NOS: 108 y 109.
36. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-35, que tiene la fucosa reducida en relación a la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo producido en células de ovario de hámster chino de tipo salvaje.
37. El anticuerpo para la reivindicación 35 que no tiene fucosa.
38. Una composición que comprende los anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, que tiene una región Fc, donde aproximadamente del 20-100% de los anticuerpos en la composición comprende una estructura de carbohidrato en el núcleo maduro en la región Fc que carece de una fucosa.
39. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo comprende una región Fc que ha sido alterada para cambiar uno o más de: la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o las propiedades farmacocinéticas del

- anticuerpo en comparación con la secuencia Fc de la IgG tipo salvaje, mediante la sustitución de un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de A, D, E, L, Q, T y Y, en cualquier posición o combinación de posiciones de la región Fc seleccionada a partir del grupo que consiste de: 238, 239, 246, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 314, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 434, 435, 437, 438 y 439.
- 10 40. La composición de la reivindicación 38 ó 39, donde el anticuerpo tiene actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas, o tiene actividad de ADCC incrementada en presencia de células efectoras humanas en comparación con el mismo anticuerpo si comprendiera la Fc de la IgG1 de tipo salvaje.
- 15 41. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo además comprende una sustitución en Fc que es 268D, o 326D, o 333A junto con 334A, o 298A junto con 333A, o 298A junto con 334A, , o 239D junto con 332E, o 239D junto con 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332A, o 239D junto con 268D y 298A y 326A y 332E, o 20 239D junto con 268D y 283L y 298A y 332E, o 239D junto con 268D y 283L y 298A y 326A y 332E, o 239D junto con 330L y 332E.
42. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo se une a FcγRIII.
43. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo se une a FcγRIII con mejor afinidad, o media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) más eficientemente, que una glicoproteína con una 25 estructura de carbohidrato de núcleo maduro en la región Fc que incluye una fucosa unida a la región Fc de la glicoproteína.
44. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 38-43, donde el anticuerpo ha sido producido por una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 30 45. La composición de la reivindicación 44, donde la célula CHO es una célula Lec13.

46. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 38-45, donde el anticuerpo ha sido producido por una célula de mamífero que carece del gen de la fucosiltransferasa.
47. La composición de la reivindicación 46, donde el gen de la fucosiltransferasa
5 es el gen *FUT8*.
48. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo está libre de N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.
49. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo tiene N-
10 acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante unida a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.
50. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo tiene uno o más residuos de galactosa unidos a su estructura de carbohidrato de núcleo maduro.
51. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo está libre de uno
15 o más residuos de galactosa unidos a su estructura de carbohidrato en el núcleo maduro.
52. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo tiene uno o más residuos de ácido siálico unidos a su estructura de carbohidrato en el núcleo maduro.
- 20 53. La composición de la reivindicación 38, donde el anticuerpo está libre de uno o más residuos de ácido siálico unidos a su estructura de carbohidrato en el núcleo maduro.
54. La composición de la reivindicación 38, que comprende al menos un 2% de los anticuerpos afucosilados.
- 25 55. La composición de la reivindicación 38, que comprende al menos un 4% de los anticuerpos afucosilados.
56. La composición de la reivindicación 38, que comprende al menos un 10% de los anticuerpos afucosilados.
57. La composición de la reivindicación 38, que comprende al menos un 19% de
30 los anticuerpos afucosilados.

58. La composición de la reivindicación 38, que comprende aproximadamente el 100% de los anticuerpos afucosilados.
59. Un anticuerpo anti-idiotipo que se une específicamente al anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 37.
- 5 60. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 y un portador.
61. La composición de la reivindicación 60 que comprende además un segundo medicamento, donde el anticuerpo anti-LT α es el primer medicamento.
62. La composición de la reivindicación 61, donde el segundo medicamento es un
10 agente inmunosupresor, un antagonista que se une a un marcador de la superficie de las células B, un antagonista de BAFF, un fármaco anti-reumático que modifica una enfermedad (DMARD), un antagonista de integrina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un antagonista de citocinas, o una combinación de los mismos.
- 15 63. Un hibridoma depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) el 19 de abril de 2006, bajo el depósito No. PTA-7538.
64. Un anticuerpo que es secretado por un hibridoma de la reivindicación 63.
65. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37.
- 20 66. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 65.
67. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 65.
68. Un método de producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula
25 hospedera de la reivindicación 67 bajo condiciones para producir el anticuerpo y recuperar el anticuerpo.
69. Un método de inhibir la proliferación celular activada por linfotoxina- α , dicho método que comprende contactar una célula o tejido con una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37.

70. Un método de tratar un trastorno autoinmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37.
71. El método de la reivindicación 70, donde el trastorno autoinmune es
5 seleccionado a partir del grupo que consiste de artritis reumatoide, lupus, enfermedad de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple (MS), psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus,
10 síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, helicobacter pylori, gastritis, y hepatitis C crónica
72. El método de la reivindicación 71, donde el trastorno autoinmune es artritis reumatoide, MS, síndrome de Sjogren, lupus, miastenia gravis, o IBD.
- 15 73. El método de la reivindicación 72, donde el trastorno autoinmune es artritis reumatoide, IBD, lupus, o MS.
74. El método de la reivindicación 73, donde el lupus es lupus eritematoso sistémico o nefritis lúpica, y la BID es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
75. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-74, donde un segundo
20 medicamento se administra en una cantidad efectiva, donde el anticuerpo anti-LT α es el primer medicamento.
76. El método de la reivindicación 75, donde el segundo medicamento es más que un medicamento.
77. El método de la reivindicación 75 ó 76, donde el segundo medicamento es un
25 agente inmunosupresor, un antagonista que se une a un marcador de la superficie de las células B, un antagonista de BAFF, un fármaco anti-reumático que modifica una enfermedad (DMARD), un antagonista de integrina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un antagonista de citocinas, o una combinación de los mismos.
- 30 78. El método de la reivindicación 77, donde el segundo medicamento es un DMARD o metotrexato.

79. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-78, donde el sujeto nunca ha sido previamente tratado con un medicamento para el trastorno.
80. El método de la reivindicación 79, donde el sujeto nunca ha sido previamente tratado con un antagonista del TNF.
- 5 81. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-78, donde el sujeto ha sido previamente tratado con un medicamento para el trastorno.
82. El método de la reivindicación 81 donde el sujeto ha sido previamente tratado con un antagonista del TNF o un DMARD.
83. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-82, donde el anticuerpo es
10 un anticuerpo desnudo.
84. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-82, donde el anticuerpo está conjugado con otra molécula.
85. El método de la reivindicación 84, donde la otra molécula es un agente citotóxico.
- 15 86. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-85, donde el anticuerpo se administra por vía intravenosa.
87. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-85, donde el anticuerpo se administra por vía subcutánea.
88. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-87, donde el sujeto tiene
20 artritis reumatoide y el anticuerpo induce una respuesta clínica importante en el sujeto.
89. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-88, donde el sujeto tiene un nivel anormal de una o más citocinas reguladoras, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-factor reumatoide (RF), creatinina, nitrógeno ureico en
25 sangre, anticuerpos anti-endoteliales, anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), células CD20 infiltrantes, anticuerpos anti-ADN de doble cadena (dsDNA), anticuerpos anti-Sm, anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares, anticuerpos anti-fosfolípidos, anticuerpos anti-ribosomales P, anticuerpos anti-Ro/SS-A, anticuerpos anti-Ro, anticuerpos anti-La, anticuerpos dirigidos contra los
30 antígenos A o B asociados al síndrome de Sjögren's (SS-A o SS-B), anticuerpos

dirigidos contra la proteína B del centrómero (CENP B) o la proteína C del centrómero (CENP C), autoanticuerpos para ICA69, anticuerpos anti-antígeno Smith (Sm), anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares, anticuerpos anti-ribosomales P, autoanticuerpos de tinción de la zona nuclear o perinuclear de los neutrófilos (pANCA), anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el gangliósido Gm1 o con el gangliósido GQ1b, anti-receptor de la acetilcolina (CAIS), anti-subtipo AchR, o anticuerpos anti-tirosina quinasa específica de músculo (MuSk), anticuerpos anti-células endoteliales del suero, IgG o anticuerpos anti-desmogleína (Dsg), anti-centrómero, anti-topoisomerasa-1 (Scl-70), anti-ARN polimerasa o anti-U3-ribonucleoproteína (U3-RNP), anticuerpos anti-membrana basal glomerular (GBM), anticuerpos anti-mitocondriales (AMA) o anti-mitocondriales M2 anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anticuerpos anti-tiroglobina (TG) o anti-receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), anticuerpos anti-nucleico (AN), anti-actina (AA) o anti-antígeno del músculo liso (ASM), anticuerpos IgA anti-endomisial, IgA anti-transglutaminasa tisular, IgA anti-gliadina o IgG anti-gliadina, anticuerpos anti-CYP21A2, anti-CYP11A1 o anti-CYP17, anticuerpos anti-ribonucleoproteína (RNP), o específicos para la miositis, anticuerpos anti-glicoproteína asociada a mielina (MAG), anticuerpos anti-virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpos anti-gangliósido Gm1, anti-sulfato-3-glicuronil paraglobósido (SGPG), o anticuerpos IgM anti-glicoconjugado, anticuerpos IgM anti-gangliósido, anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anti-tiroglobina (TG) o anti-receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), anticuerpos anti-proteína básica de la mielina o anti-glicoproteína oligodendrocítica de la mielina, anticuerpos IgM del factor reumatoide dirigidos contra la porción Fc de la IgG, anticuerpos anti-Factor VIII o una combinación de los mismos.

90. El método de cualquiera de las reivindicaciones 70-89, donde el anticuerpo se administra no más de aproximadamente una vez cada dos semanas.

91. El método de la reivindicación 90, donde el anticuerpo se administra una vez al mes.

92. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en él, donde la composición comprende el anticuerpo de cualquiera de

las reivindicaciones 1-37, y un prospecto, que indica que la composición puede ser utilizada para tratar un trastorno autoinmune.

93. El artículo de la reivindicación 92, que comprende además un recipiente que comprende un segundo medicamento, donde el anticuerpo es un primer
5 medicamento, y que comprende además instrucciones en el prospecto para tratar al sujeto con el segundo medicamento.

94. El artículo de la reivindicación 93, donde el segundo medicamento es un agente inmunosupresor, un antagonista que se une a un marcador de la superficie de las células B, un antagonista de BAFF, un fármaco anti-reumático que modifica
10 una enfermedad (DMARD), un antagonista de integrina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un antagonista de citocinas, o una combinación de los mismos.

95. Un método de promover el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende
15 promover, a un público objetivo, el uso del anticuerpo o la composición farmacéutica del mismo, para tratar a un paciente o una población de pacientes que exhiben una enfermedad autoinmune.

96. El método de la reivindicación 95, donde la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, o una enfermedad inflamatoria intestinal.

97. Un artículo de fabricación que comprende, empaquetados juntos, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 y un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta
20 que indica que el anticuerpo o la composición farmacéutica es indicada para tratar pacientes con una enfermedad autoinmune.

98. El artículo de la reivindicación 97, donde que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, o una enfermedad inflamatoria intestinal.

99. El artículo de la reivindicación 97 ó 98, que además comprende un recipiente que comprende un segundo medicamento, donde el anticuerpo es el primer
30 medicamento, que comprende además instrucciones en el prospecto para tratar al paciente con una cantidad efectiva del segundo medicamento.

3/3

433

48/30/09

100. El artículo de la reivindicación 99, donde el segundo medicamento es un DMARD o metotrexato.

101. Un método para empacar el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 o una composición farmacéutica del mismo, que comprende combinar en un
5 paquete el anticuerpo o la composición farmacéutica del anticuerpo y una etiqueta que indica que el anticuerpo o la composición farmacéutica es indicada para tratar pacientes que exhiben una enfermedad autoinmune.

102. El método de la reivindicación 101, donde la enfermedad autoinmune es
10 artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, o una enfermedad inflamatoria intestinal.

RESUMEN

La invención proporciona varios anticuerpos que se unen a linfotoxina- α , métodos para hacer tales anticuerpos, composiciones y artículos que incorporan dichos anticuerpos, y sus usos en el tratamiento de, por ejemplo, un trastorno autoinmune. Los anticuerpos incluyen anticuerpos murinos, quiméricos, y humanizados.

10

15

20

25

Cadena Ligera de la Quimera 2C8

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQAVSSAVAWYQOKPGQSPKLOIYSASHRYTGVPD
RFTGSGSGTDFTFTTISSVQAEDLAVYYCQOHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTLT
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SECUENCIA NO:32)

Cadena Pesada de la Quimera 2C8

EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYVIHWVKQKPGQGLEWIGYNNPYNDGTNY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGTTLTVSAAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SECUENCIA NO:33)

FIG. 1A

Cadena Ligera de la Quimera 3F12:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNFLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTR
DSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC. NO:34)

Cadena Pesada de la Quimera 3F12:

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPGSGSTNY
NEEFKKGATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSSAKTTG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. NO:35)

Región Variable de la Cadena Pesada de la Quimera 3F12:

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEISPGSGSTNY
NEEFKKGATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSS
(ID. SEC. NO:31)

FIG. 1B

Región Variable de la Cadena ligera 3F12.2D3 Anti-LT α :

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSTNQKNFLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTRDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYYSYPRTFGGGTKLEIK (ID. SEC. NO:36)

Región Constante de la Cadena Ligera 3F12.2D3 Anti-LT α :

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (ID. SEC. NO:37)

(Resaltado en negrilla se encuentran los residuos que fueron identificados a partir de diversas
escisiones químicas o enzimáticas)

FIG. 1C

Región Variable de la Cadena Pesada 3F12.2D3 Anti-LT α :

QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEISPGSGSTNYNEEF
KGKATFTADKSSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCADGYHGYWGQGTTLTVSS (ID. SEC. NO:38)

Región constante de la Cadena Pesada 3F12.2D3 Anti-LT α :

AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTNWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTM
SSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPN
IKDVLIMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYN*STIRVVSTLPIQ
HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFN
PGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGSIYISKLNMTSKWEKTDSEFSCNVRHEGLKNYYL
KKTISRSPG (ID. SEC. NO:39)

* Señala el sitio de glicosilación

(Resaltado en negrilla se encuentran los residuos que fueron identificados a partir de diversas
escisiones químicas o enzimáticas)

FIG. 1D

Cadena Ligera

	10	20	30	40
2C8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC [KASQAVSSAVA] WYQQKP			
	*	**** *	*	*
hu2C8.v2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC [RASQAVSSAVA] WYQQKP			
			** **	
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC [RASQISNYLA] WYQQKP			
	50	60	70	80
2C8	GQSPKLQIY [SASHRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA			
	**	*	*	*
hu2C8.v2	GKAPKLQIY [SASHRYT] GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQF			
	*	* ****		
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQF			
	90	100		
2C8	EDLAVYYC [QQHYSTPWT] FGGGTKVEIKR (ID. SEC. NO:23)			
	* *	*		
hu2C8.v2	EDFATYYC [QQHYSTPWT] FGQGTKVEIKR (ID. SEC. NO:24)			
		** *		
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR (ID. SEC. NO:40)			

FIG. 2A

Cadena Pesada

	10	20	30	40
2C8	EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKAS [GYTFTSYVIH] WVKQK			
	**	** *	*	*
hu2C8.v2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYVIH] WVRQA			
			* * **	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA			
	50	a	60	70
2C8	PGQGLEWIG [YNNPYNDGTNYNEKFKG] KATLTSDKSSSTAYM			
	*	*	*	*
hu2C8.v2	PGKGLEWVG [YNNPYNDGTNYNEKFKG] RATISSDKSKNTAYL			
	*	***** *	*	*
hum III	PGKGLEWVS [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLYL			
	90	100	110	120
2C8	ELSSLTSEDSAVYYCSR [PTMLPWFAY] WGQGTTLTVSA			
(ID. SEC. NO:25)				
	***	** *	**	*
hu2C8.v2	QMNSLRAEDTAVYYCSR [PTMLPWFAY] WGQGTTLTVSS			
(ID. SEC. NO:26)				
		*	*****	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRGGGSD-Y] WGQGTTLTVSS			
(ID. SEC. NO:41)				

FIG. 2B

Cadena Ligera para 2C8.v7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC.NO:42)

Cadena Pesada para 2C8.v7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNPYNDGTNY
 NEKFKGRATISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGLTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. NO:43)

Cadena ligera para 2C8.v12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYTGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. SEC. NO:44)

Cadena Pesada para 2C8.v12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYVIHWVRQAPGKGLEWVGYNPNPYNDGTNY
 NEKFKGRFTISSDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPTMLPWFAYWGQGLTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (ID. SEC. NO:45)

FIG. 2C

Cadeba Ligera

	10	20	abcdef 30	40
3F12	DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQKP	
	* *	** ** *		
hu3F12.v5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQQKP	
		** ***** *		
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQIS-----NYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
3F12	GQSPKLLIY [WASTRDS]	GVPDRFTGSGSGTDFTLT	ISSVKAEDLAVY	
	**	* *	*** *	
hu3F12.v5	GKAPKLLIY [WASTRDS]	GVPSRFGSGSGTDFTLT	ISSLOPEDFATY	
	* ***			
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLT	ISSLOPEDFATY	
	90	100		
3F12	YC [QQYYSYPRT]	FGGGTKLEIKR (ID. SEC.NO:27)		
		* *		
hu3F12.v5	YC [QQYYSYPRT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC.NO:28)		
	* **			
hum KI	YC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC.NO:40)		

FIG. 3A

Cadena Pesada

	10	20	30	40
3F12	QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT	[GYTFSSYWIE]	WVKQR	
	** ** *	* ** *	**	
hu3F12.v5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFSSYWIE]	WVRQA	
		* ***		
humhviii	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
3F12	PGHGLEWIG [EISPGSGSTNYNEEFKG]	KATFTADKSSNTAYI		
	* *		* * *	*
hu3F12.v5	PGKGLEWVG [EISPGSGSTNYNEEFKG]	RATFSADNSKNTAYL		
	* * ***	* ****	* * *	*
humhviii	PGKGLEWVS [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLYL		
	abc	90	100	110
3F12	QLSSLSTSEDSAVYYCAD	[GYH-G--Y]	WGQGTTLTVSSA	
(ID. SEC.NO:29)	** ** *		**	
hu3F12.v5	QMNSL-RAEDTAVYYCAD	[GYH-G--Y]	WGQGTTLTVSSA	
(ID. SEC.NO:30)				
		* *** **		
humhviii	QMNSL-RAEDTAVYYCAR	[GRGGGSDY]	WGQGTTLTVSSA	
(ID. SEC.NO:41)				

FIG. 3B

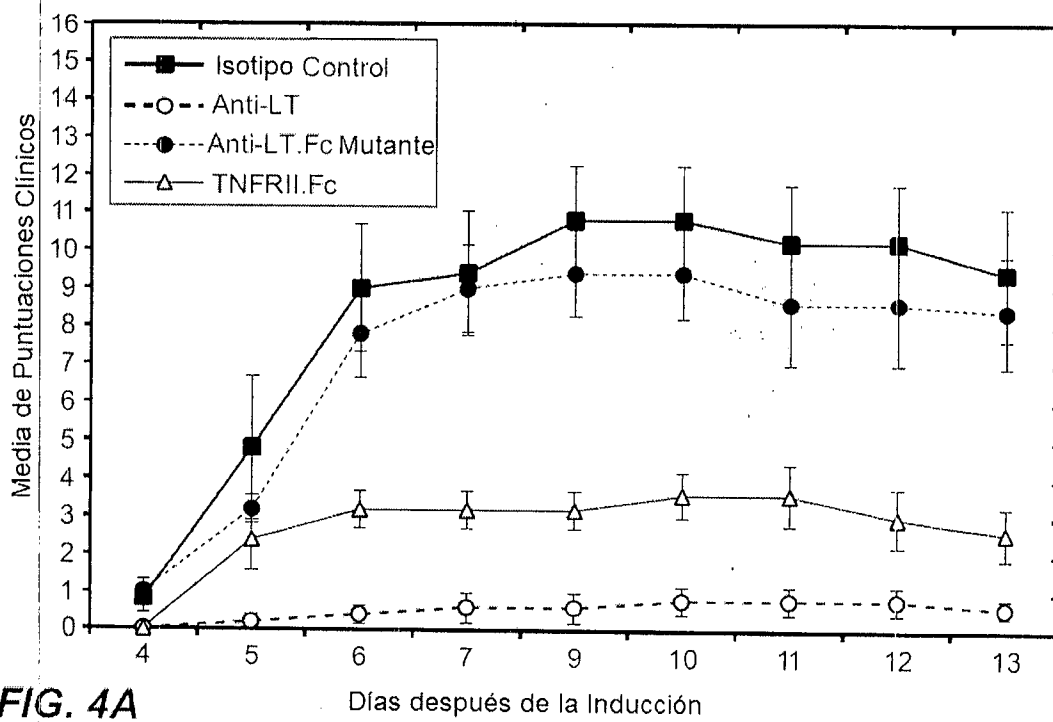


FIG. 4A

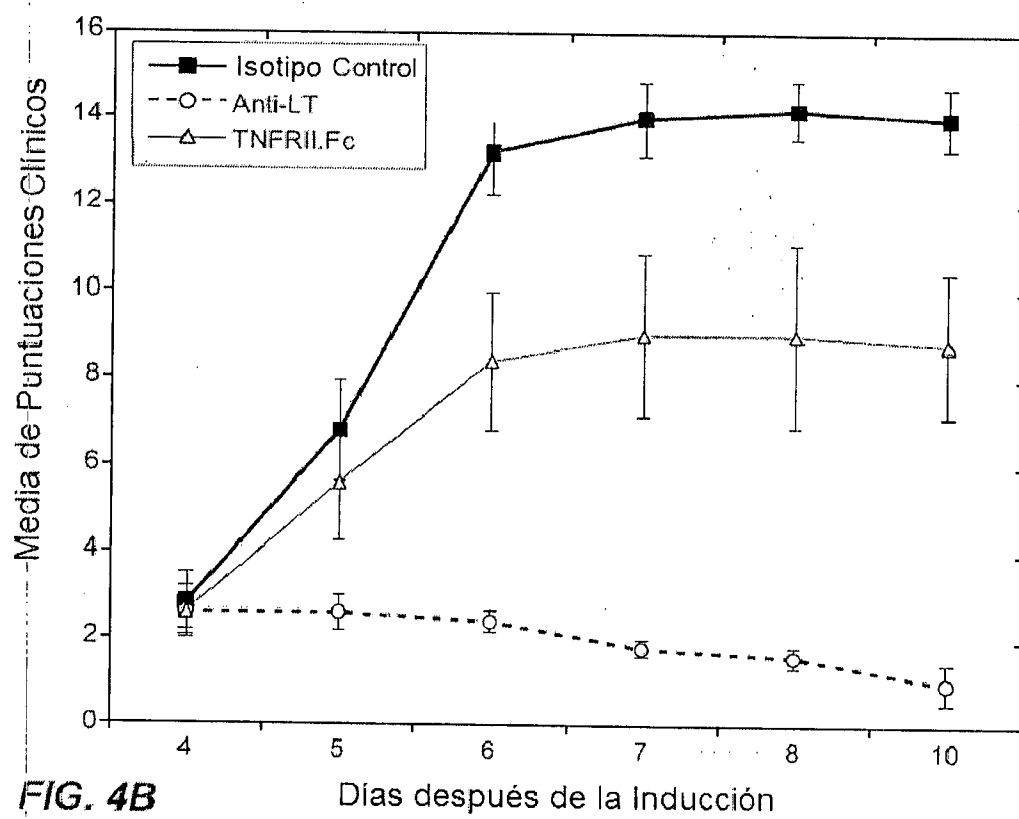


FIG. 4B

7/32

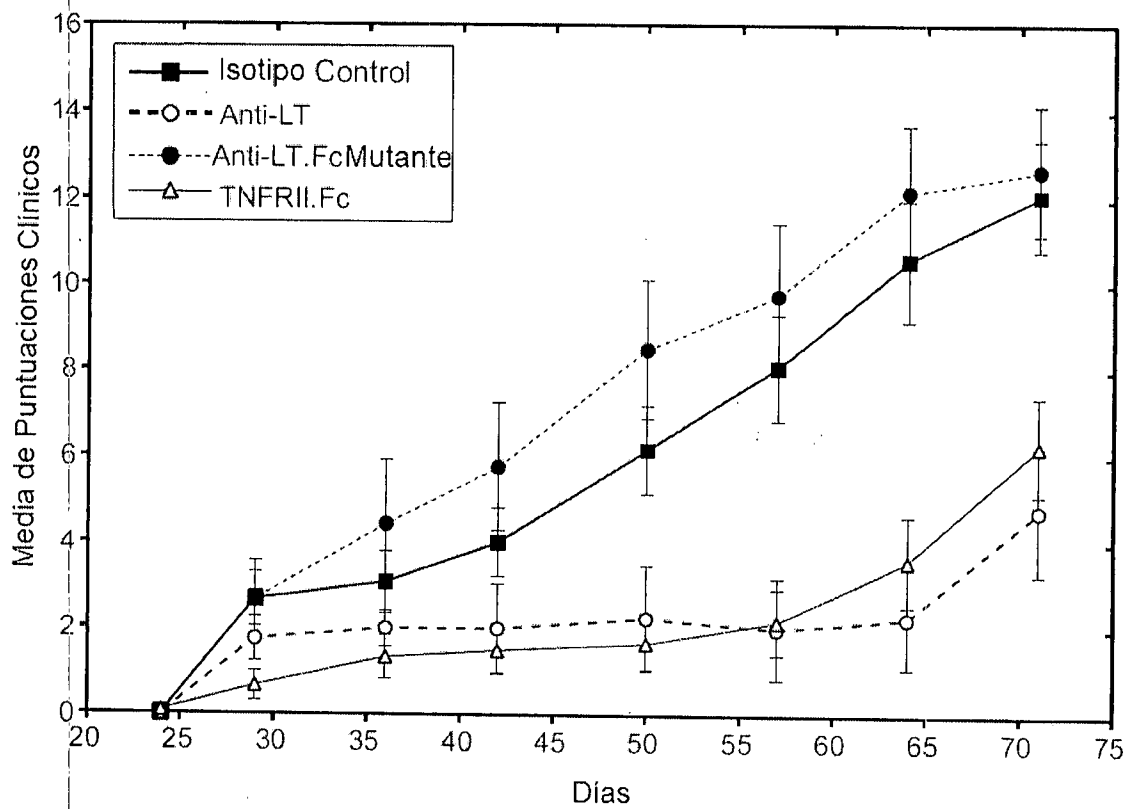


FIG. 5A

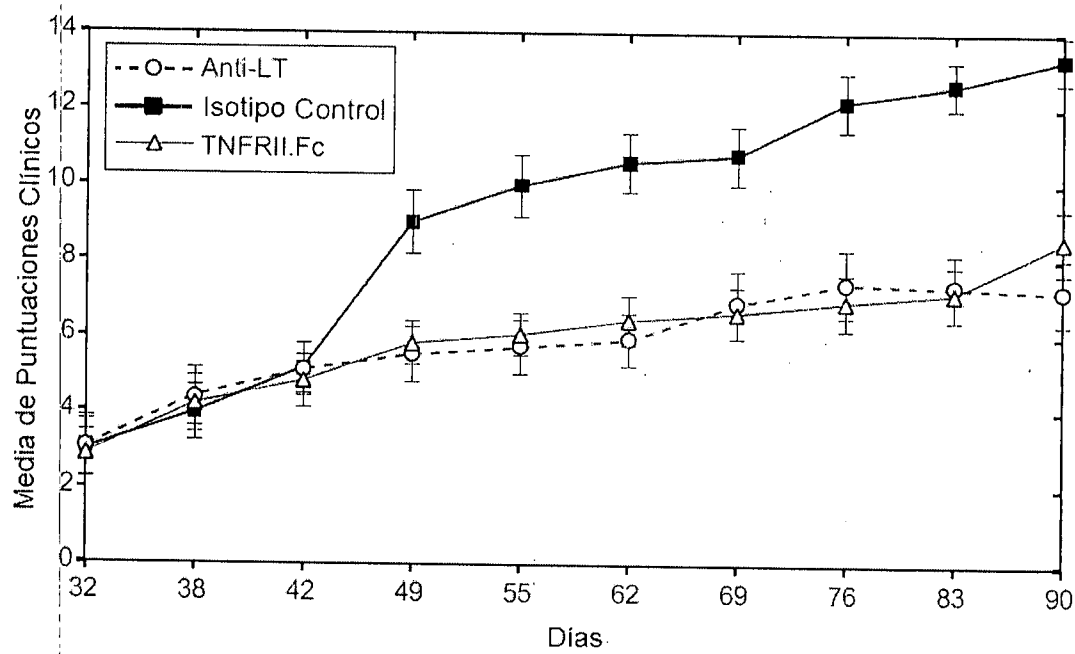


FIG. 5B

8/32

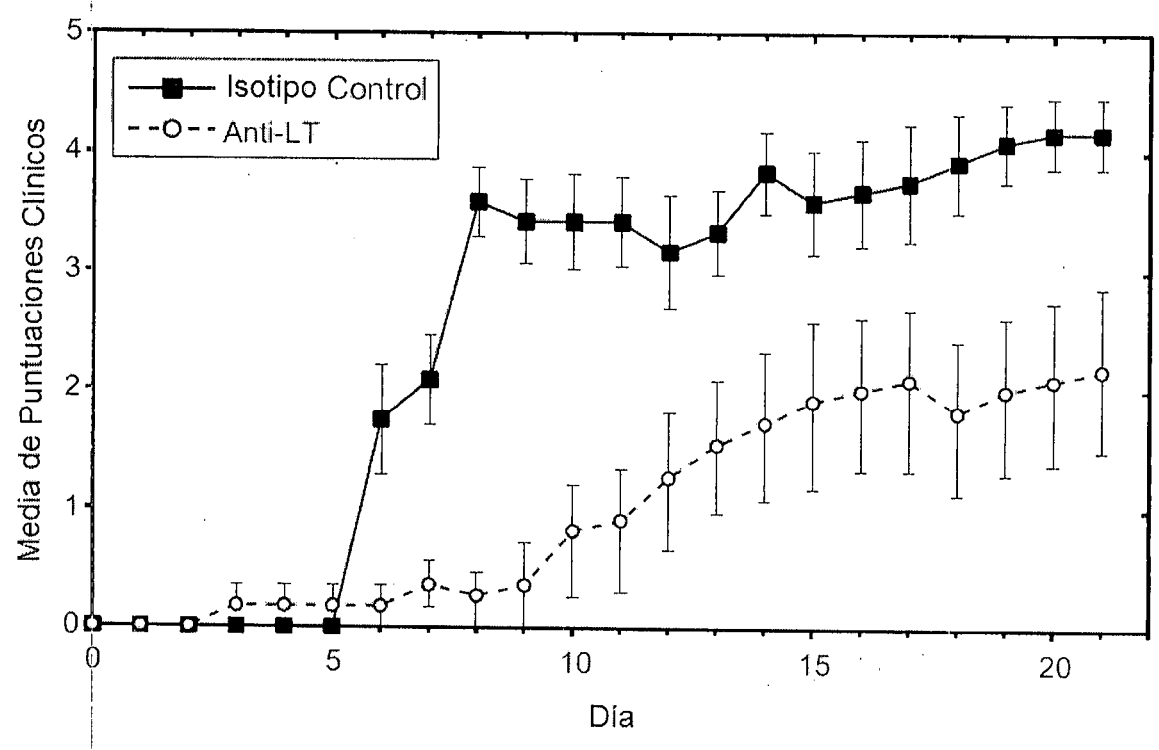


FIG. 6

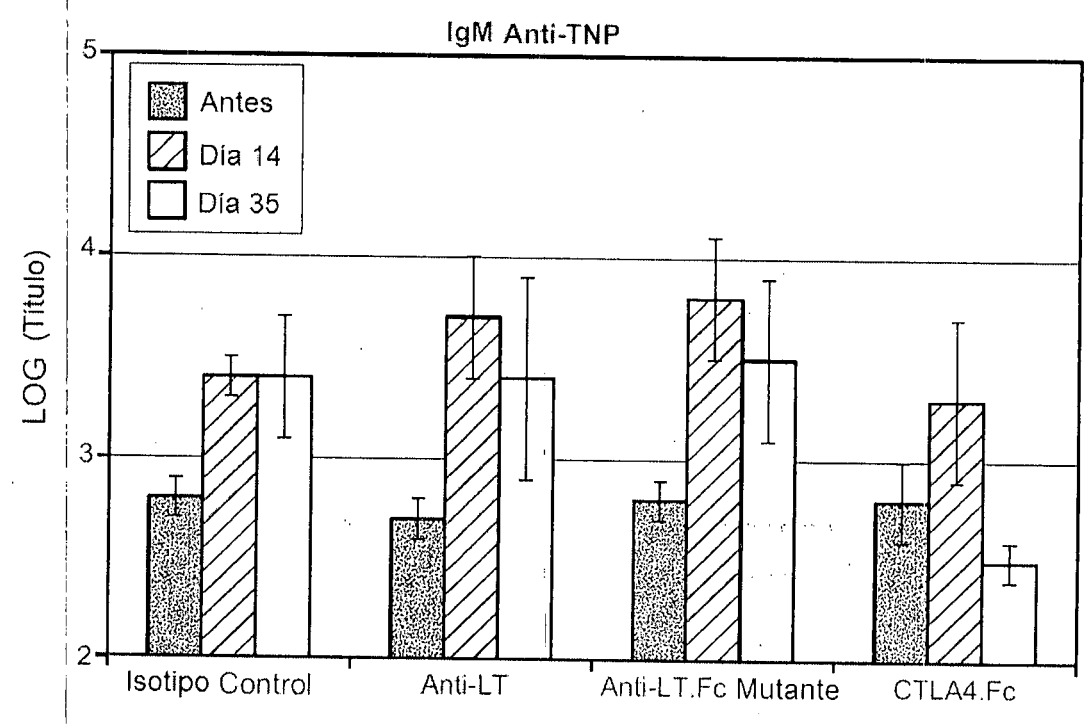


FIG. 7A

9/32

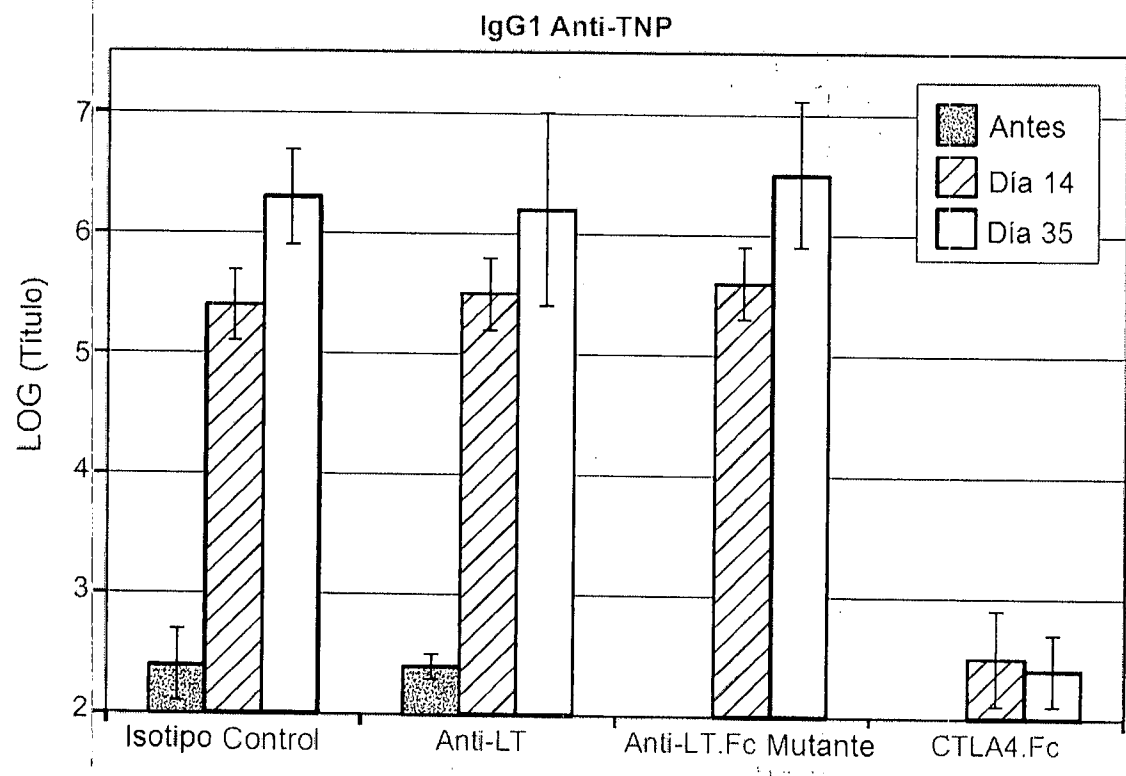


FIG. 7B

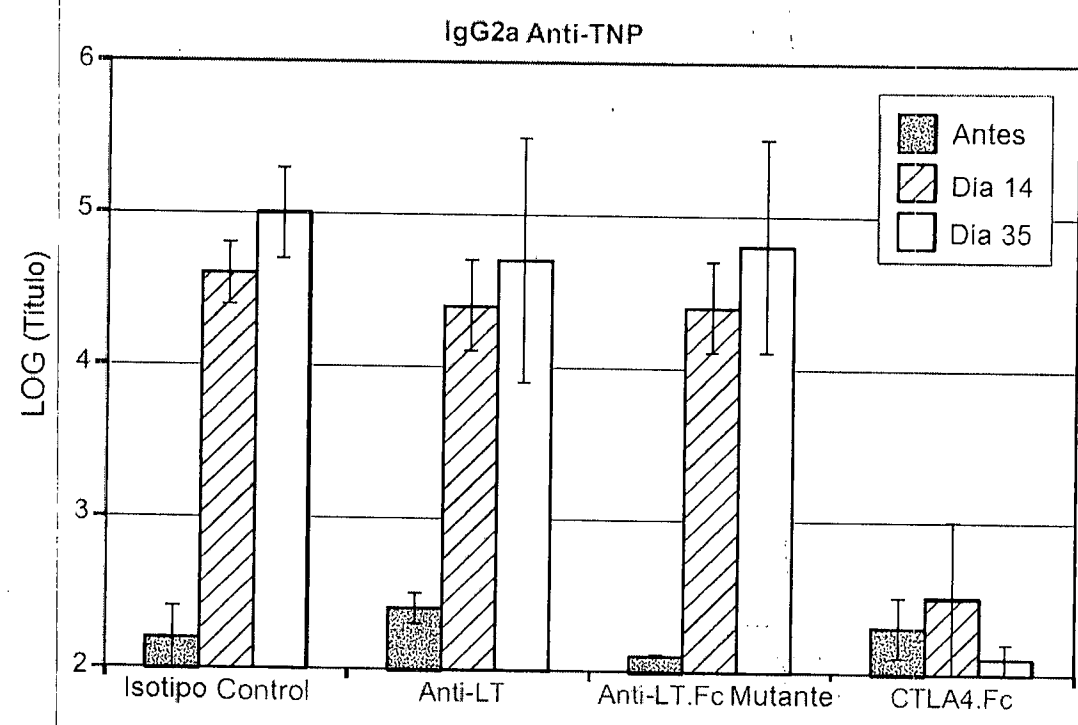


FIG. 7C

10/32

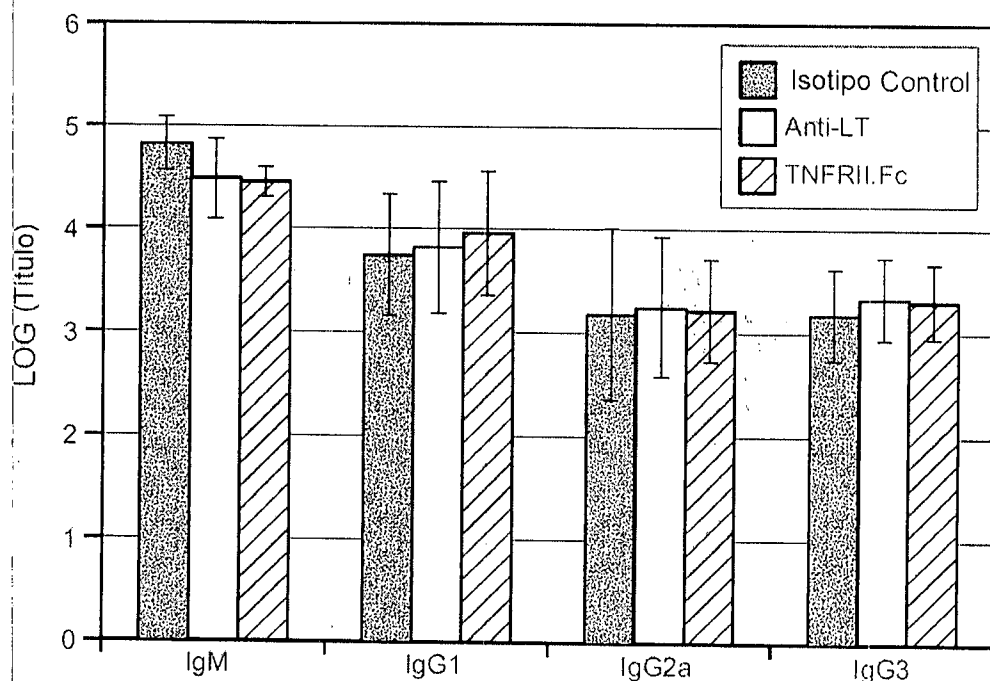


FIG. 8

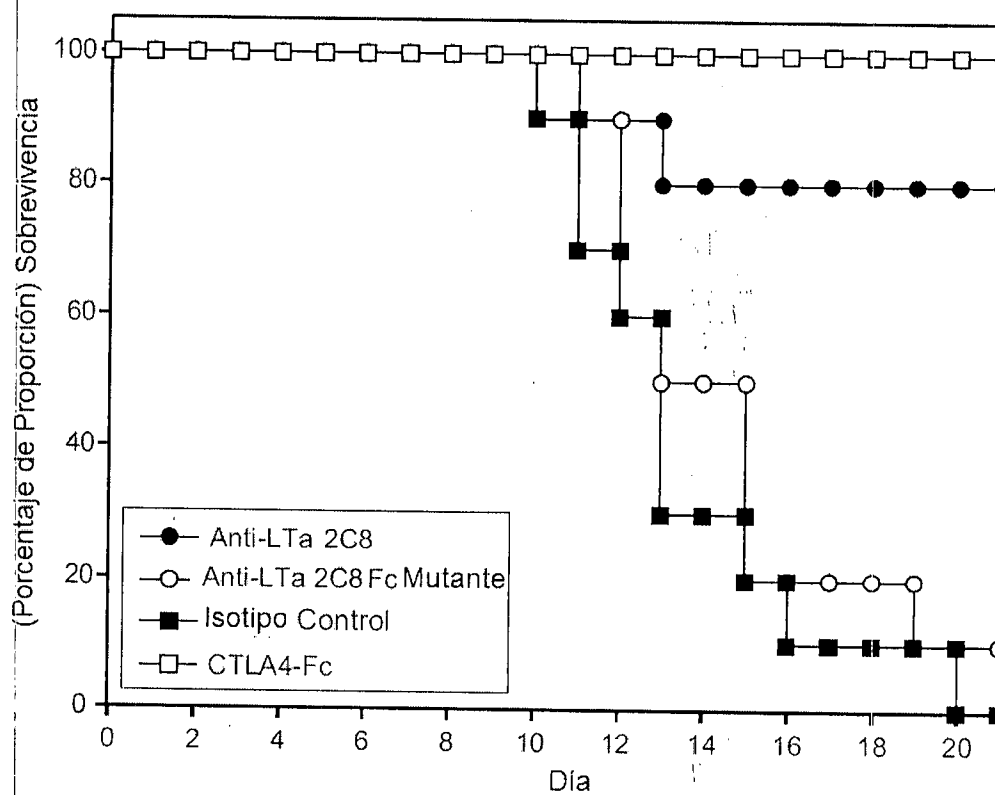


FIG. 9

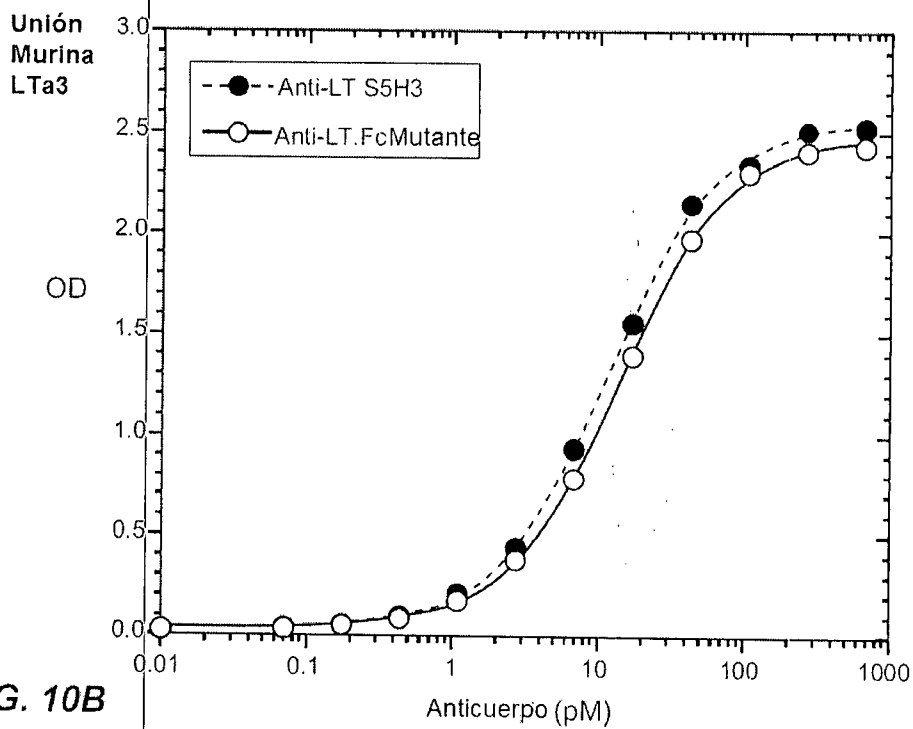


FIG. 10B

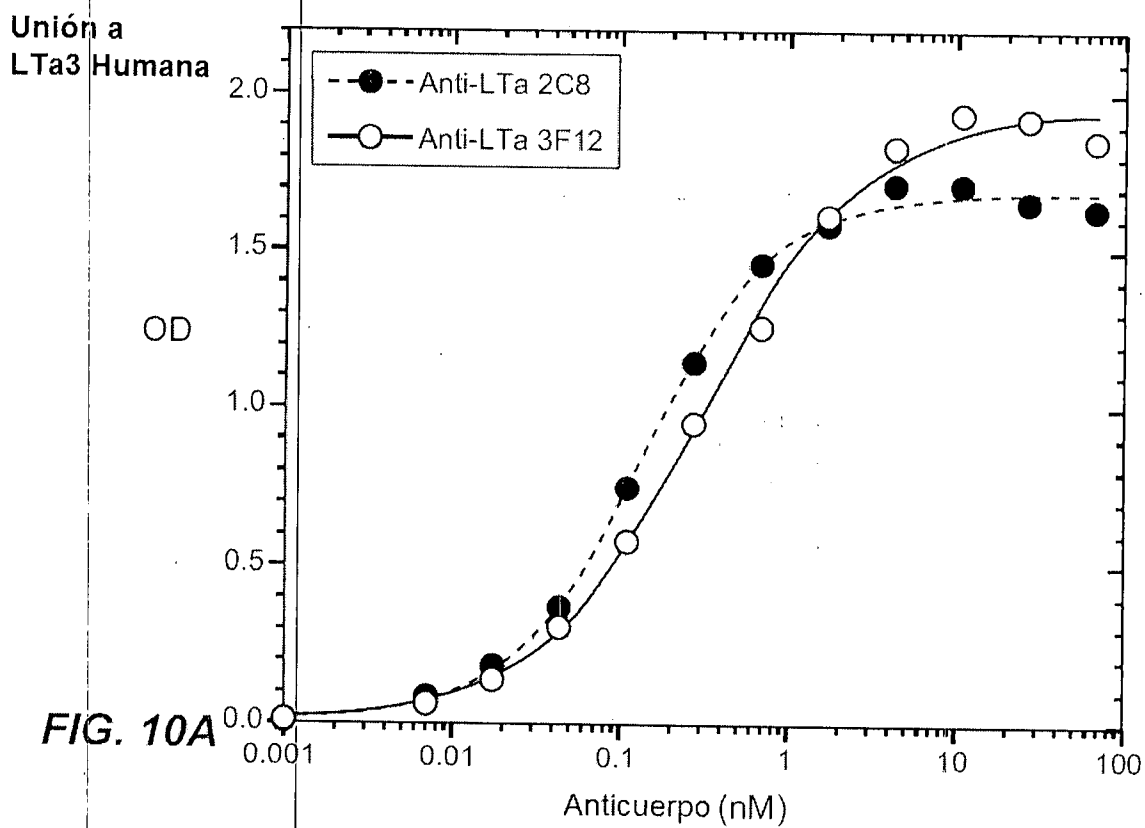


FIG. 10A

12/32

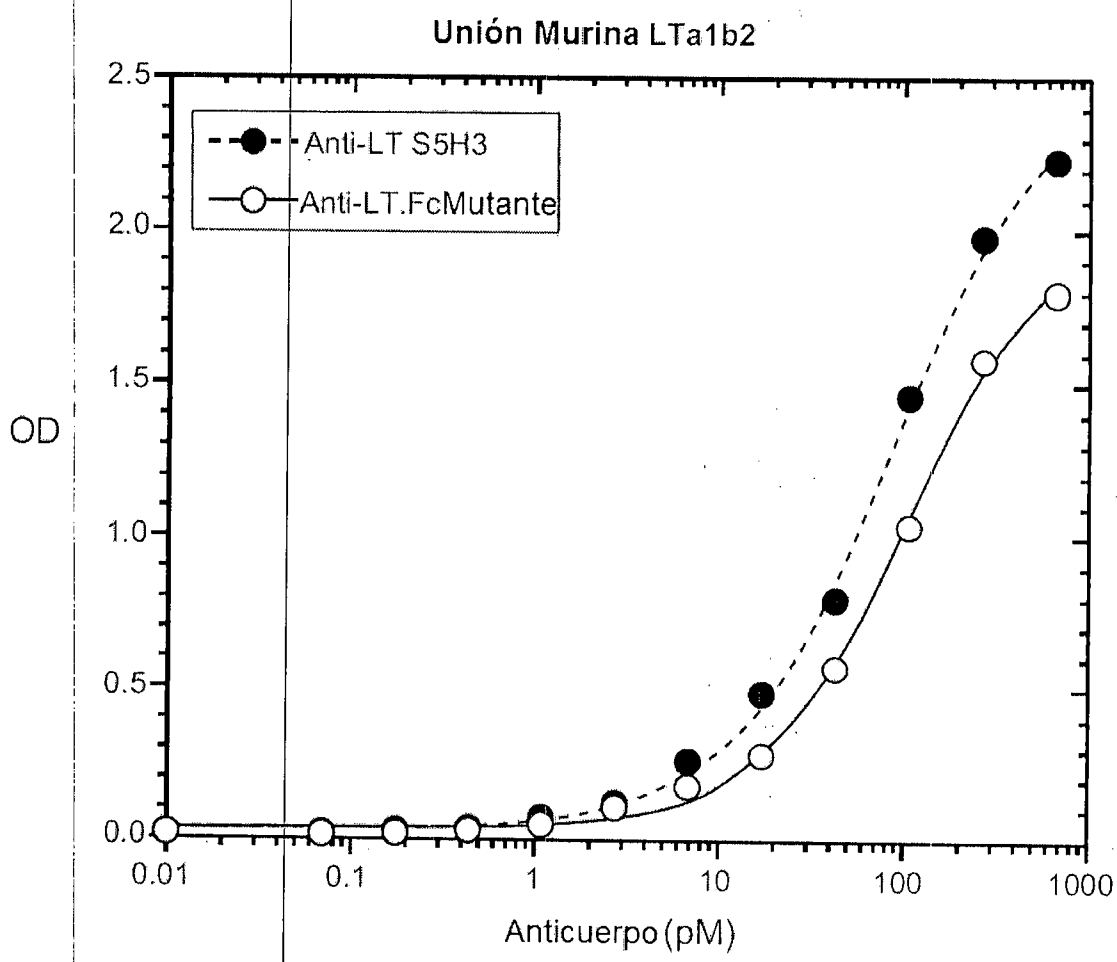


FIG. 11A

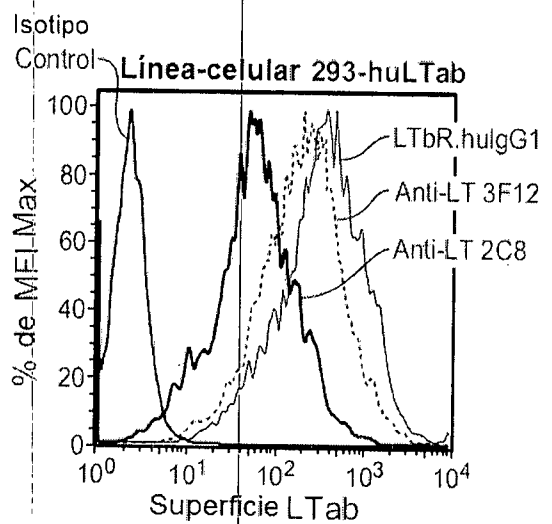


FIG. 11B

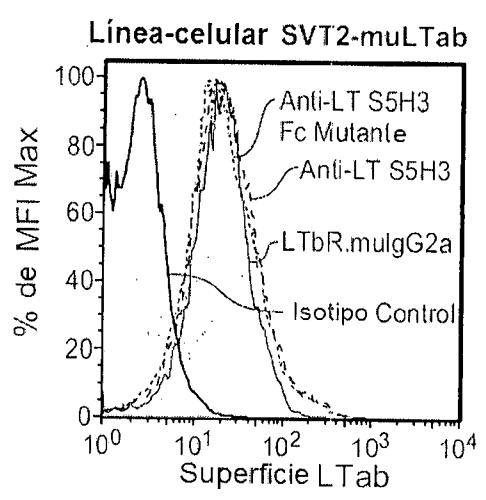


FIG. 11C

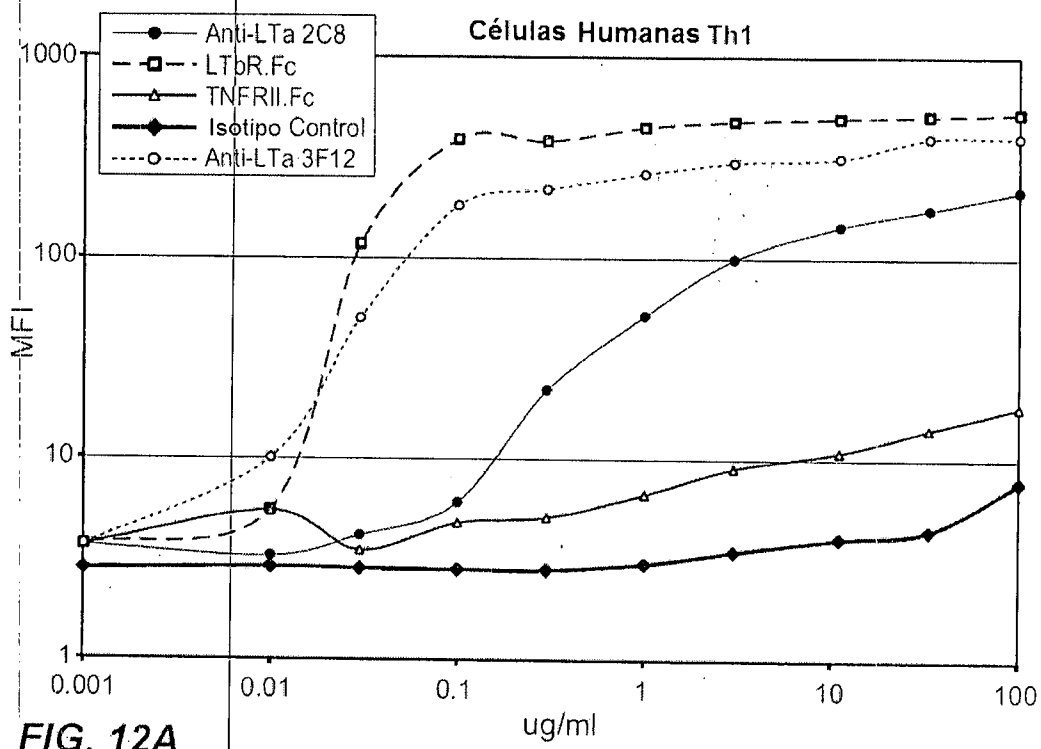


FIG. 12A

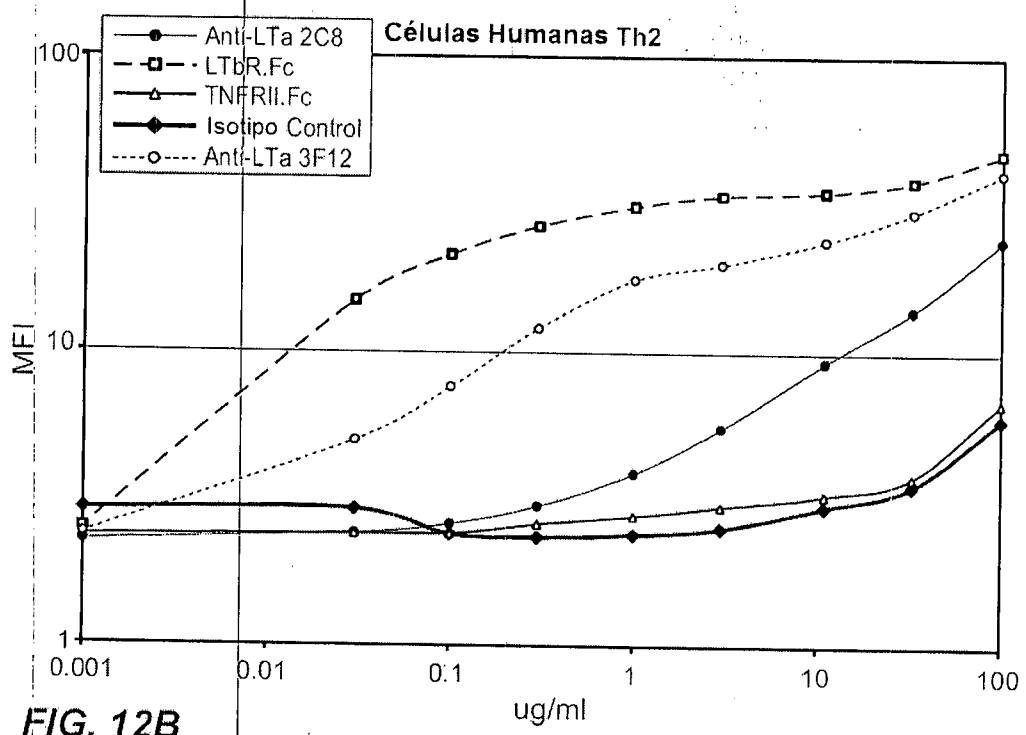


FIG. 12B

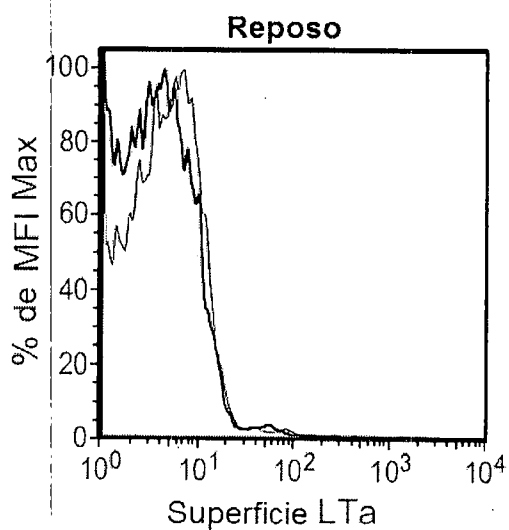


FIG. 12C

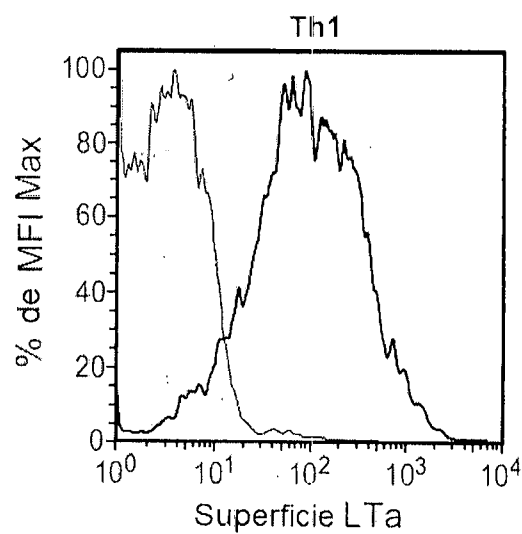


FIG. 12D

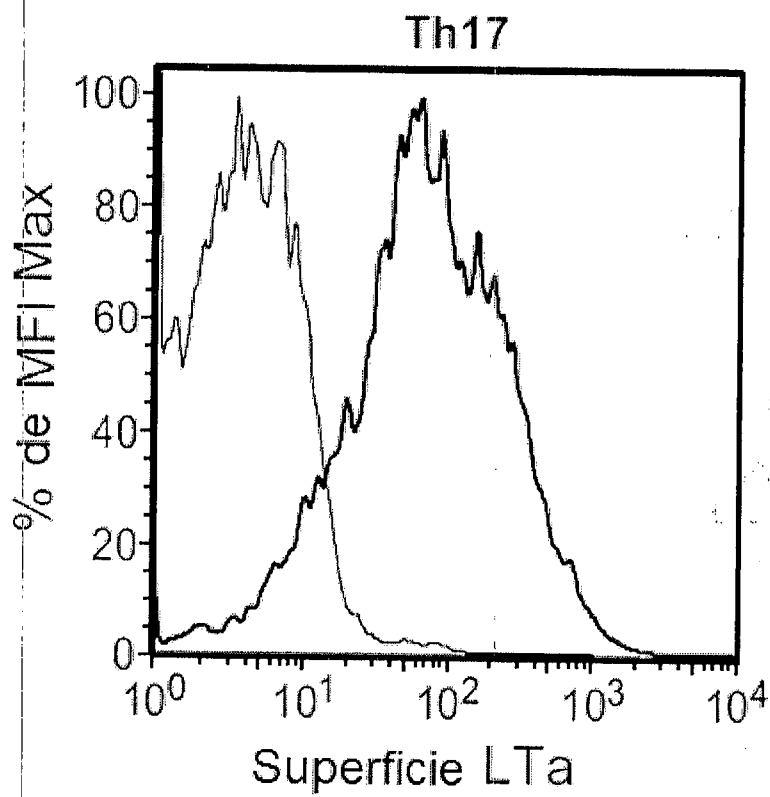


FIG. 12E

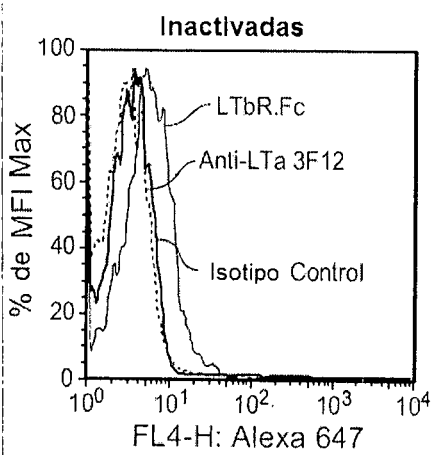


FIG. 13A

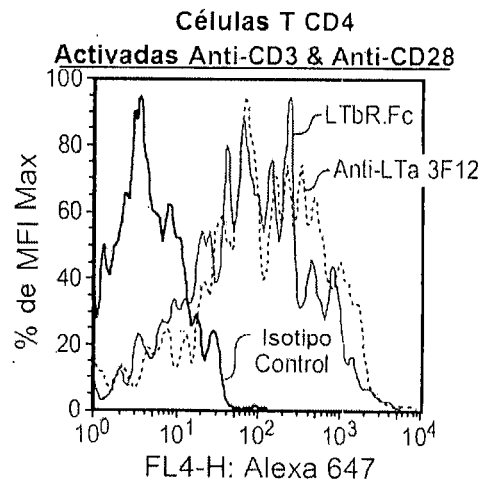


FIG. 13B

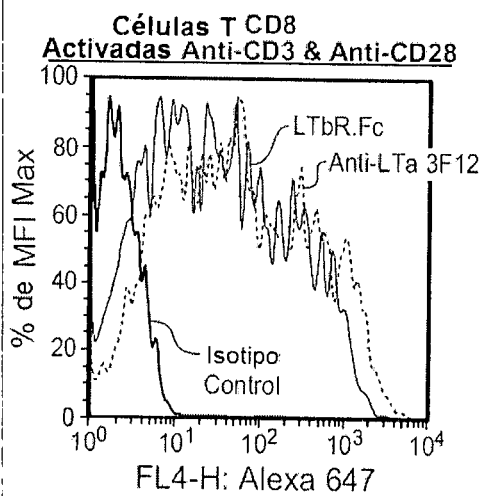


FIG. 13C

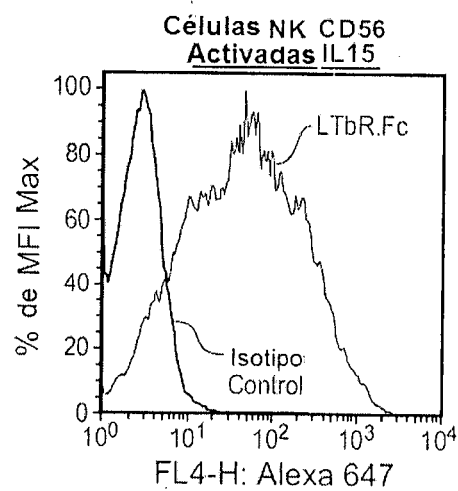


FIG. 13D

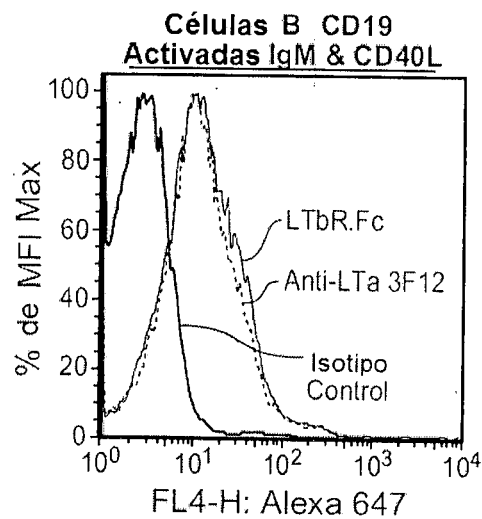


FIG. 13E

16/32

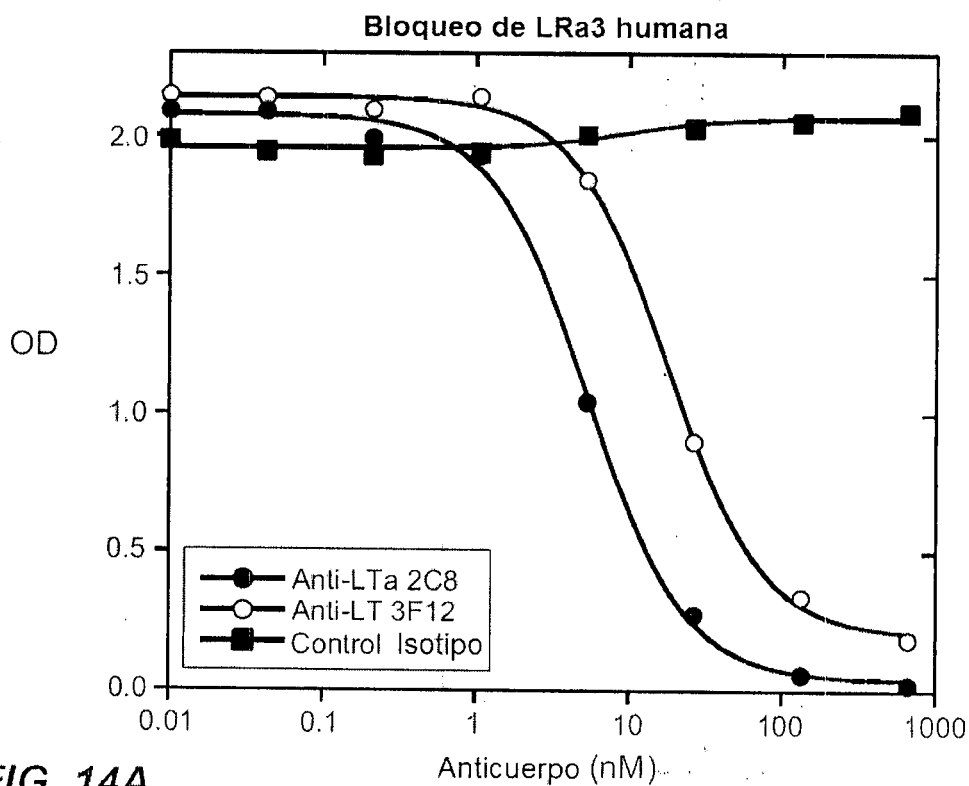


FIG. 14A

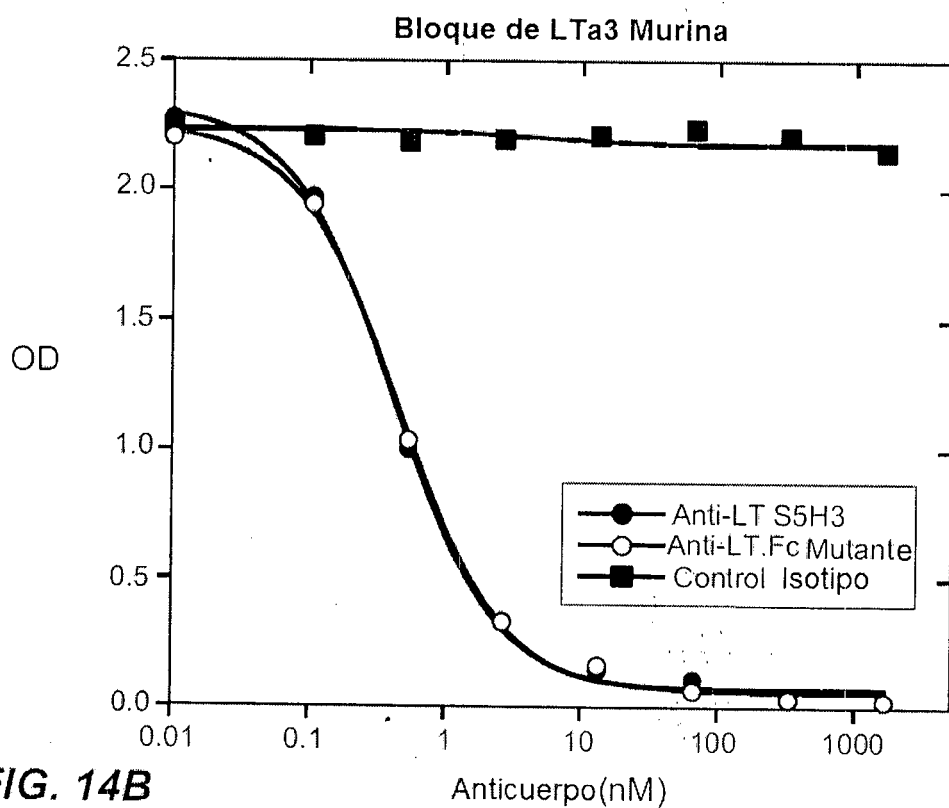


FIG. 14B

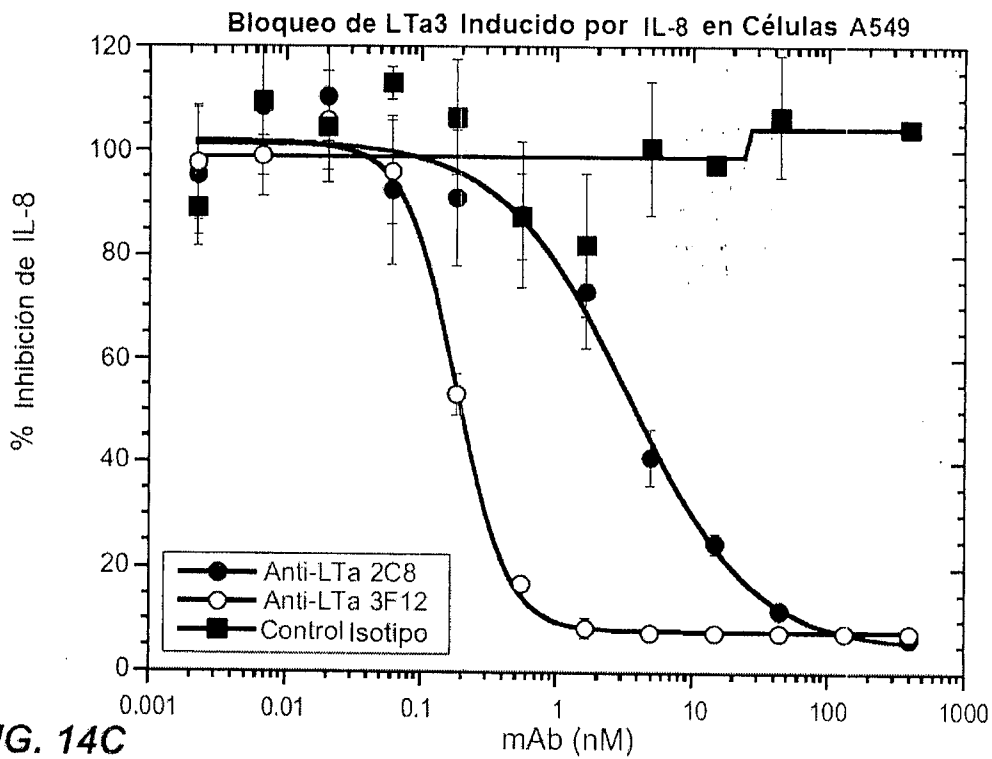


FIG. 14C

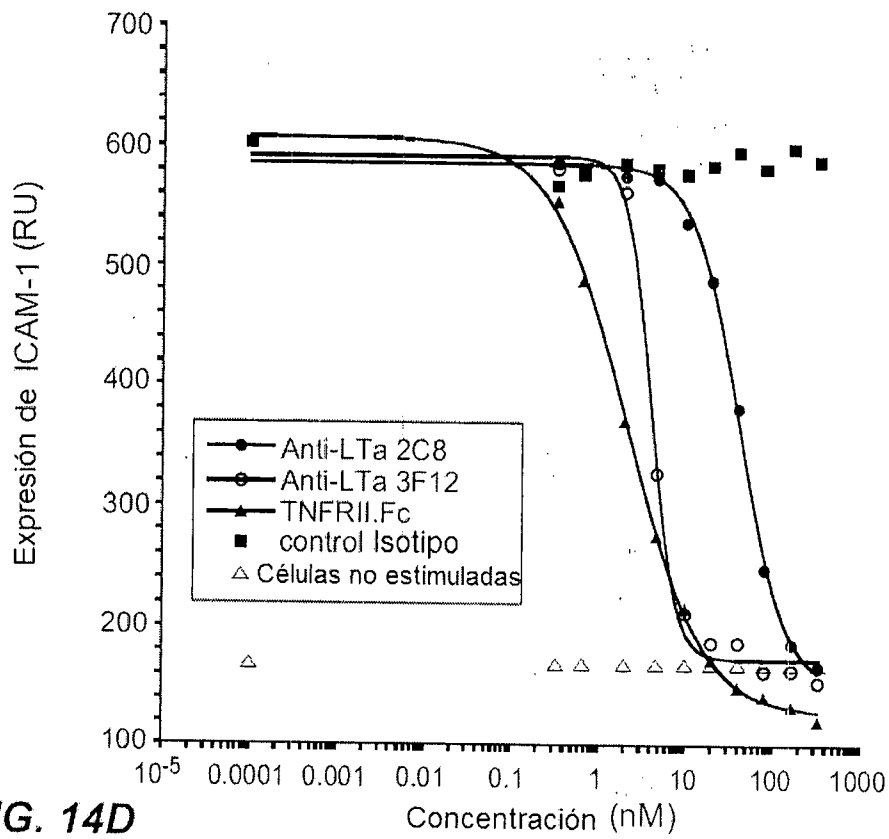


FIG. 14D

18/32

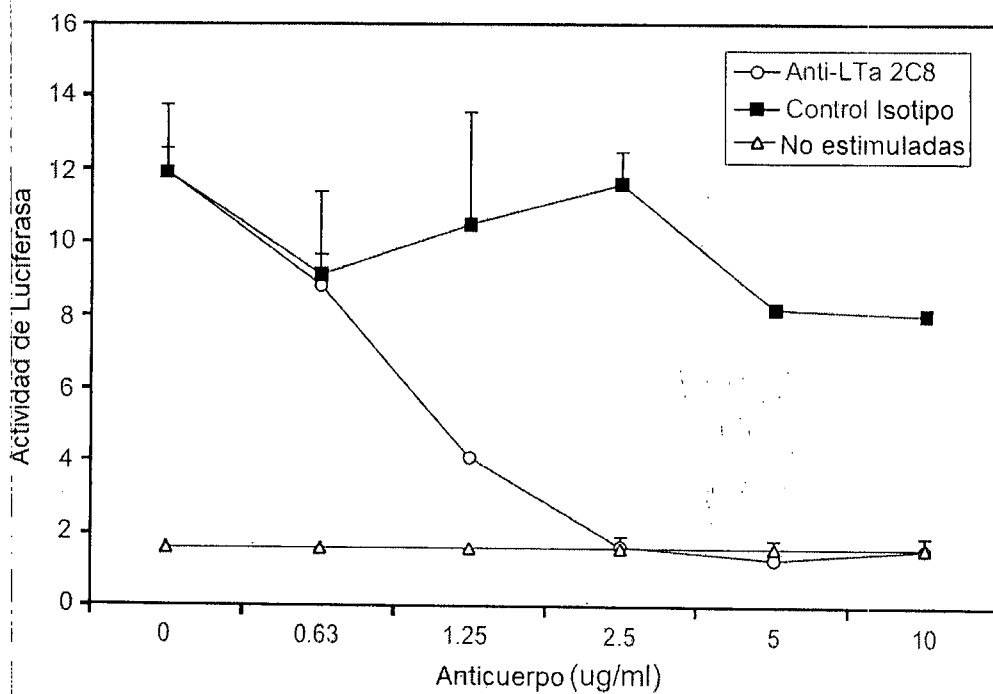


FIG. 14E

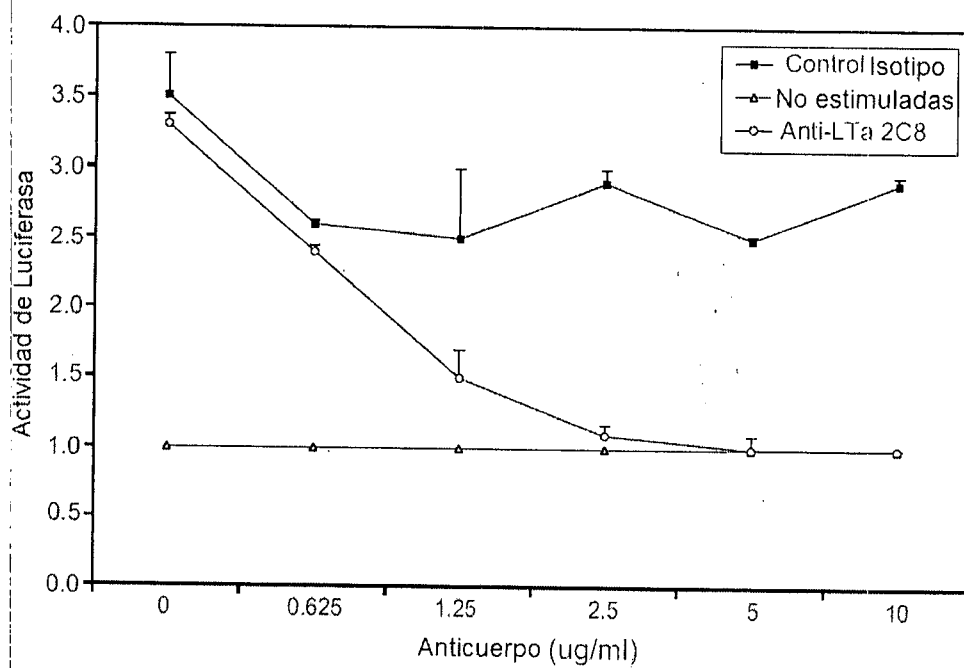


FIG. 15A

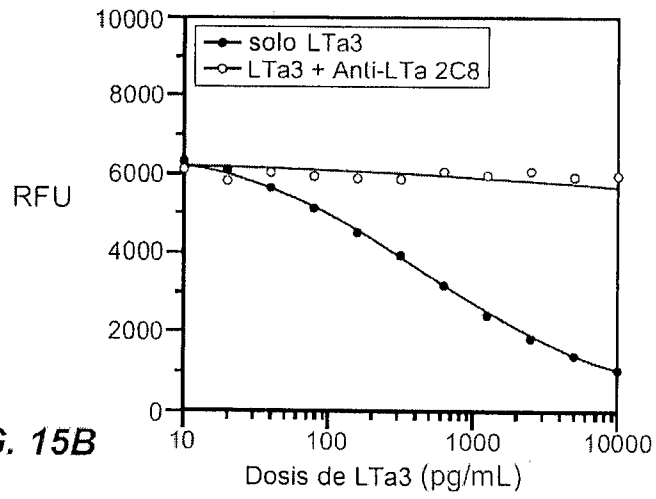


FIG. 15C

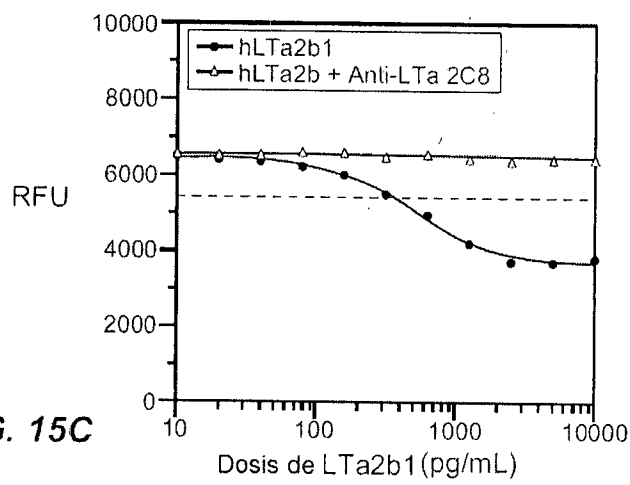
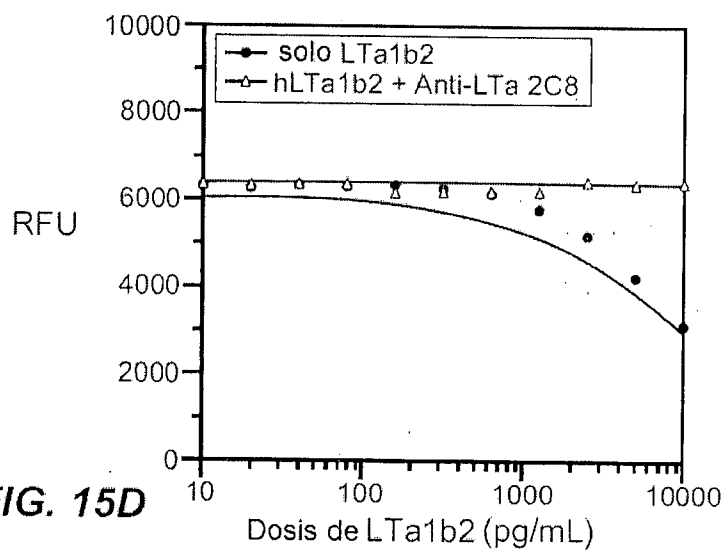


FIG. 15D



20/32

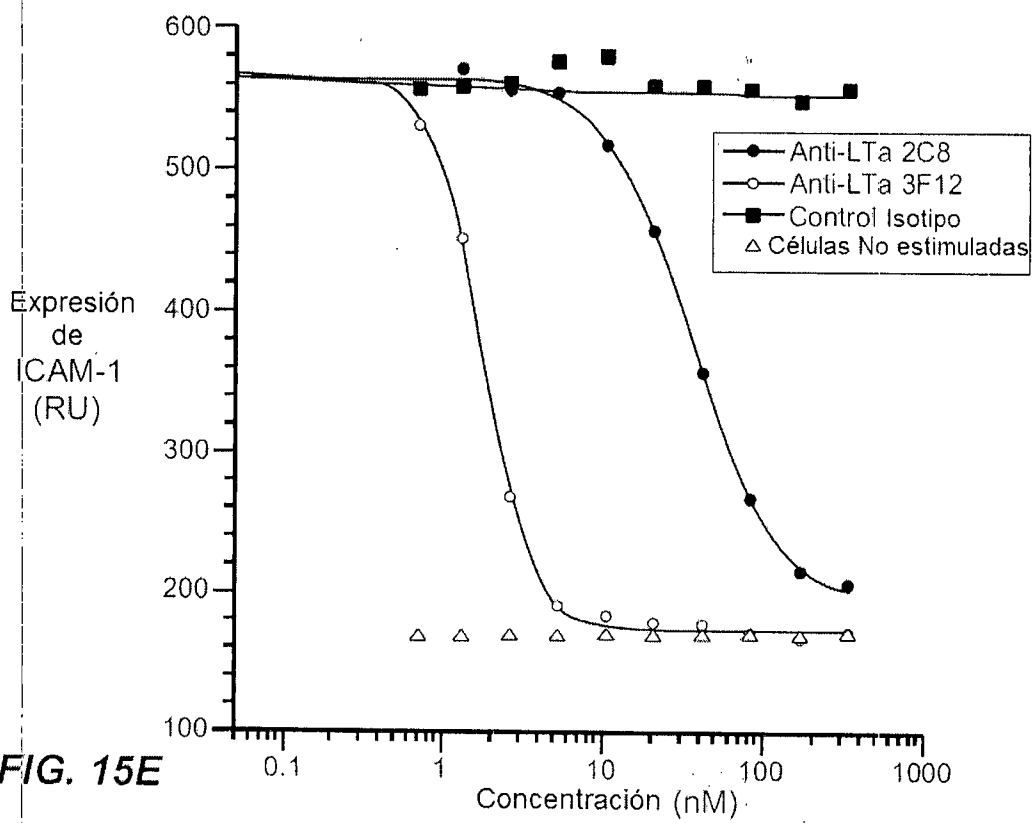


FIG. 15E

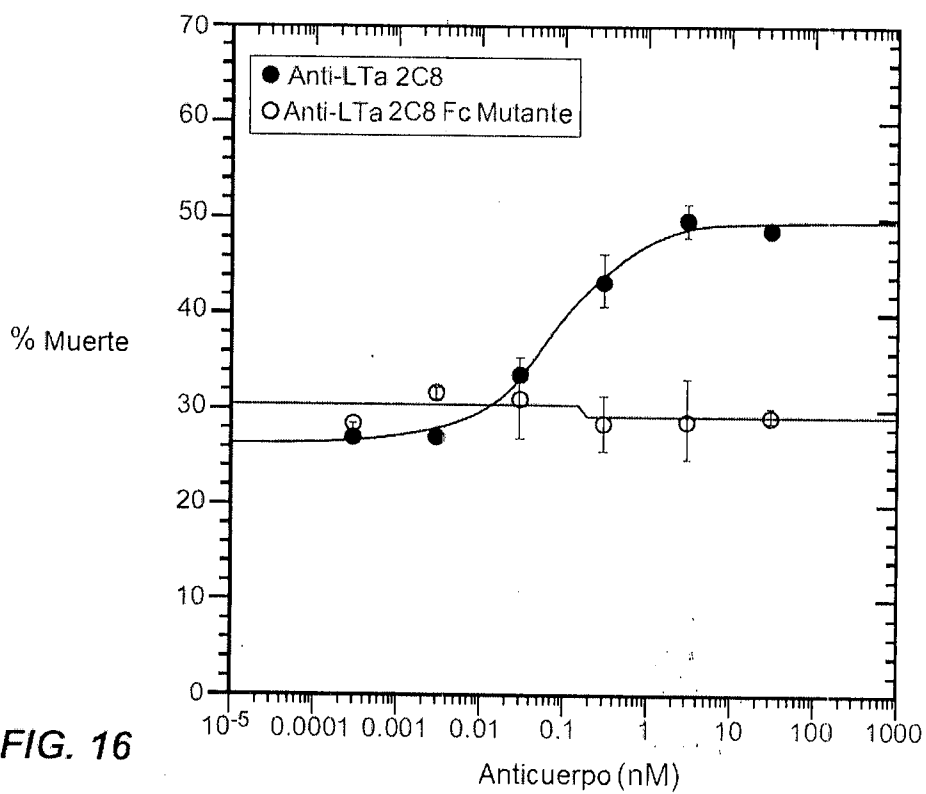


FIG. 16

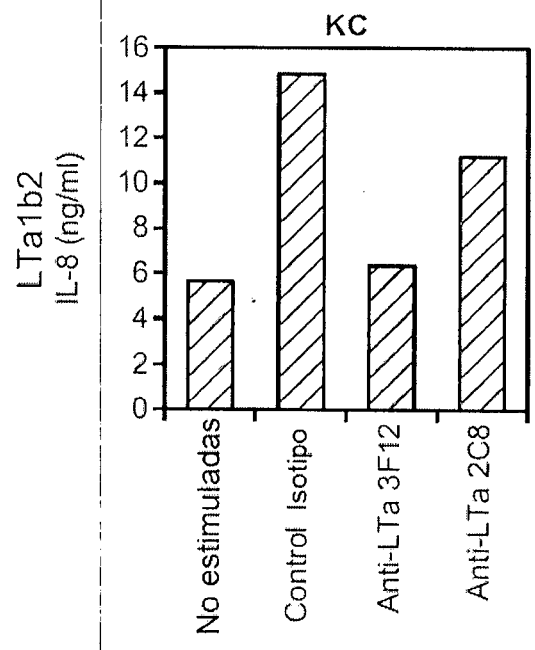


FIG. 17A

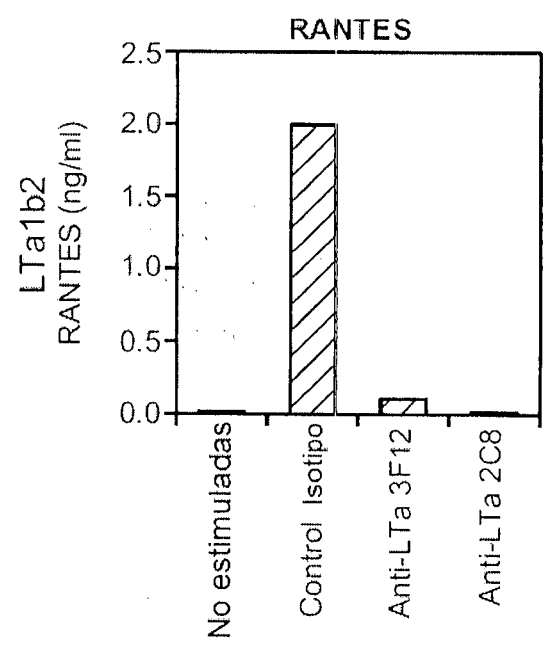


FIG. 17B

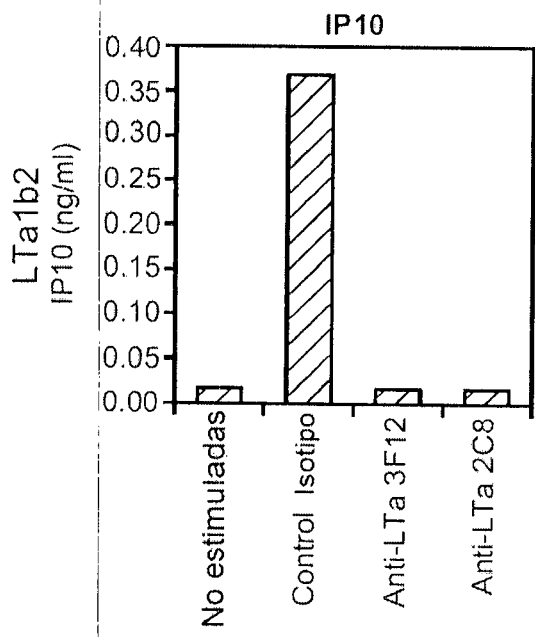


FIG. 17C

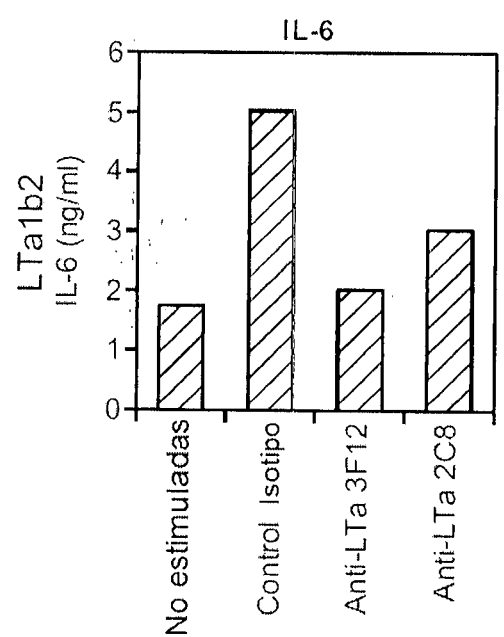


FIG. 17D

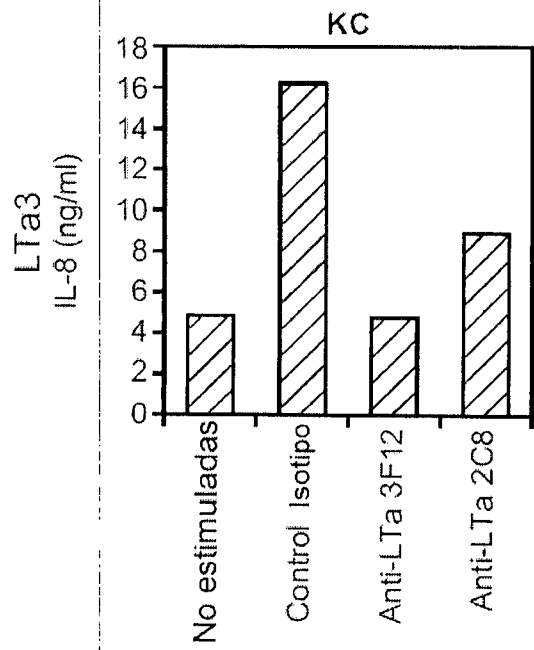


FIG. 17E

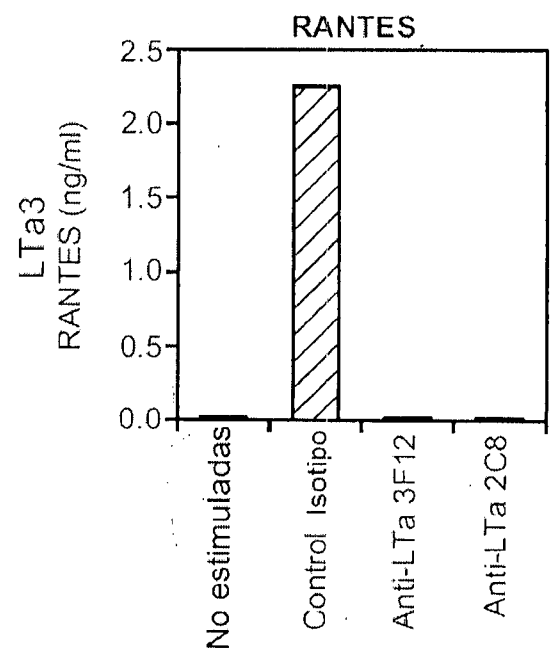


FIG. 17F

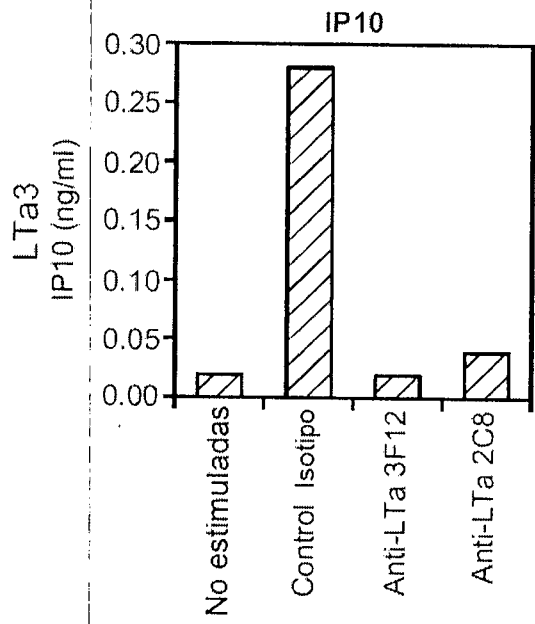


FIG. 17G

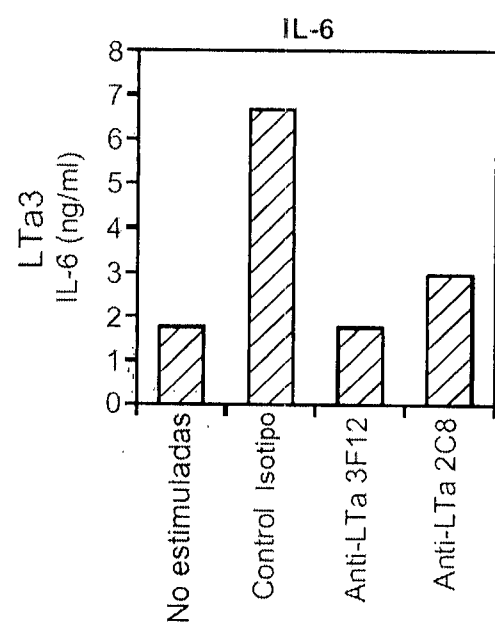


FIG. 17H

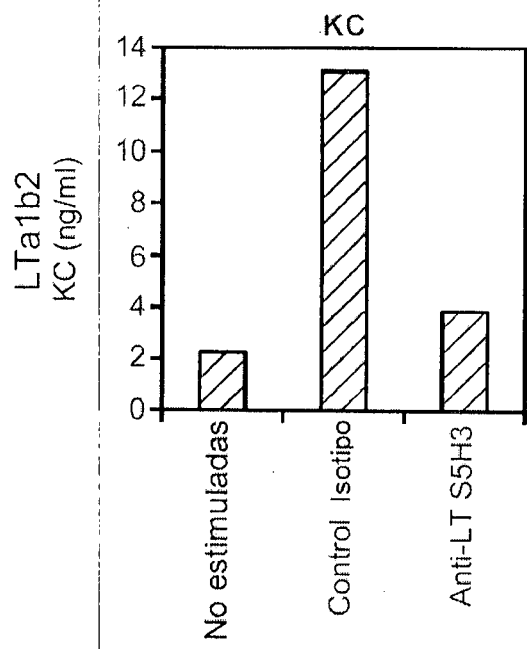


FIG. 17I

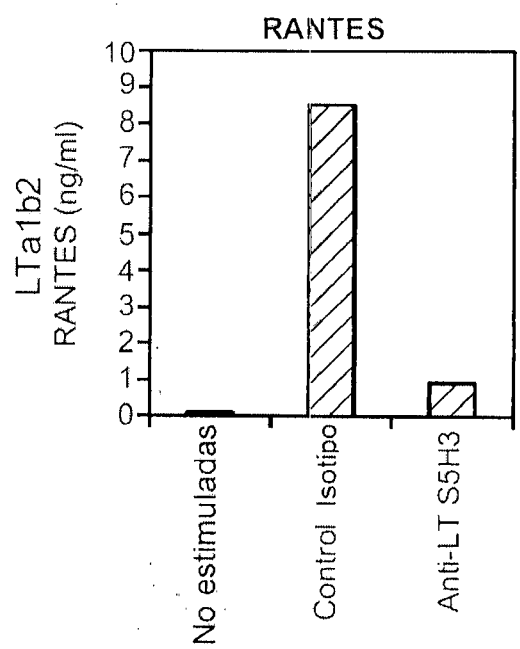


FIG. 17J

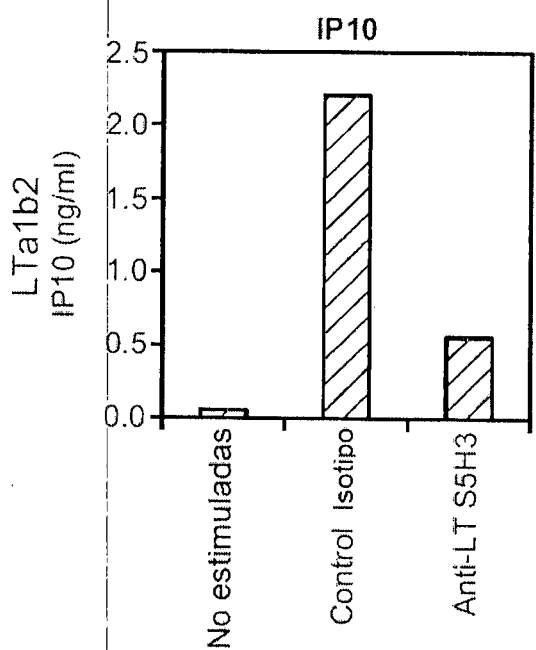


FIG. 17K

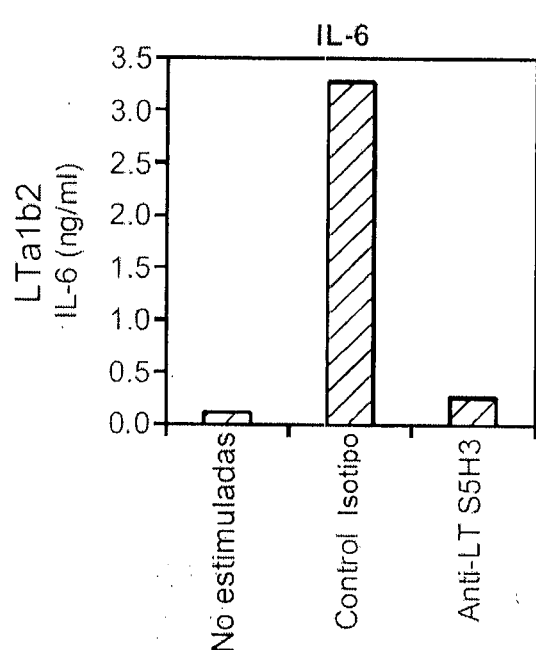


FIG. 17L

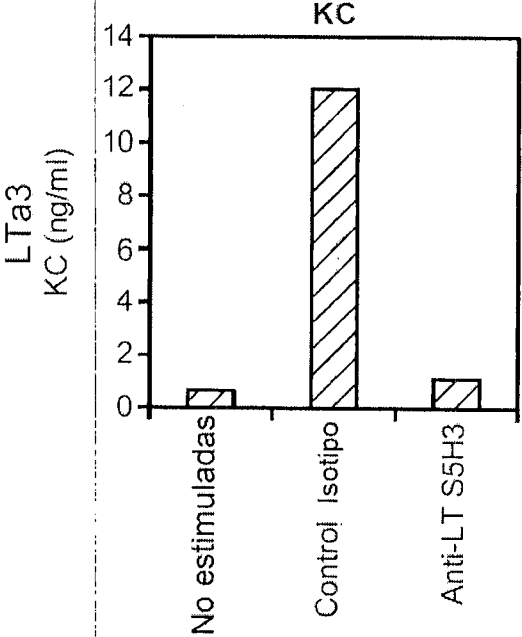


FIG. 17M

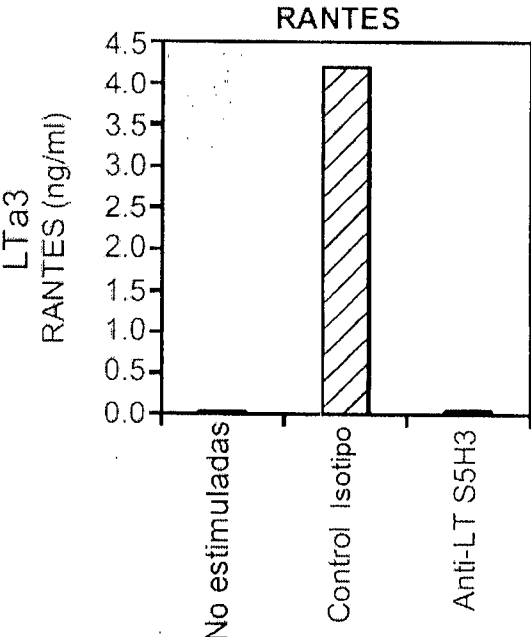


FIG. 17N

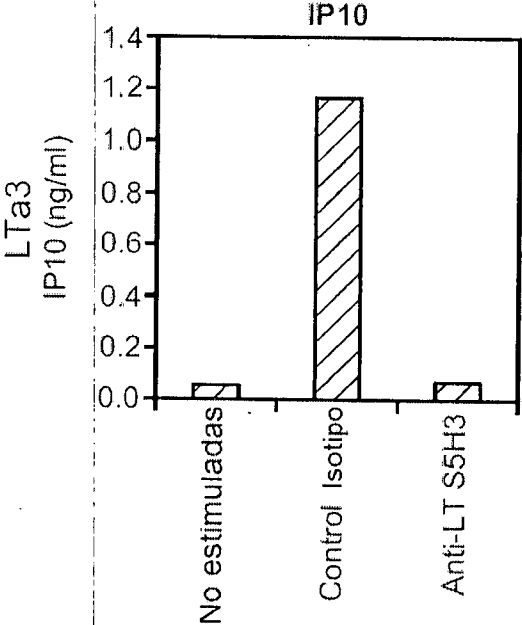


FIG. 17O

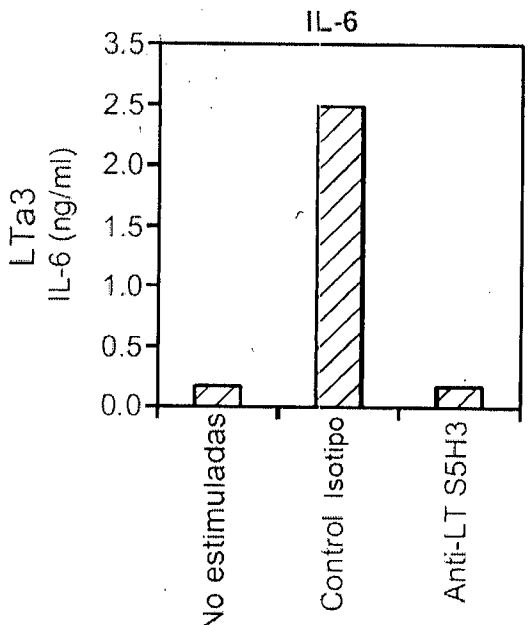


FIG. 17P

26/32

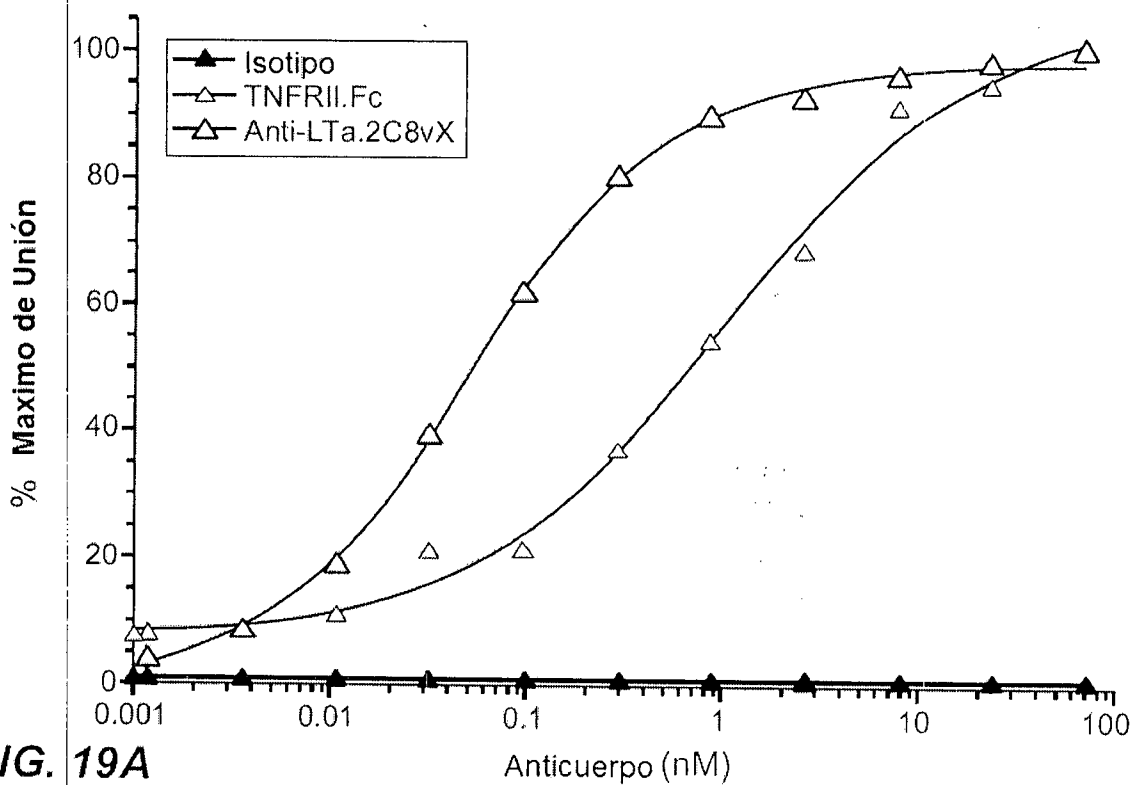


FIG. 19A

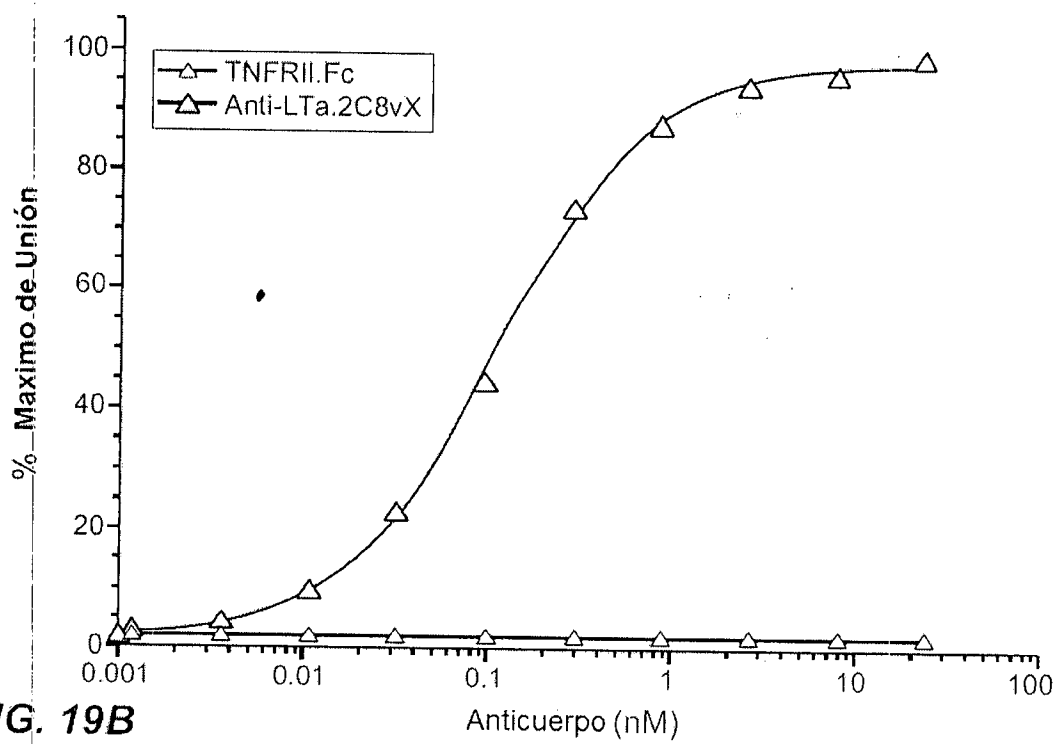


FIG. 19B

Dominio Variable Ligero

	10	20	30	40
quim.2C8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	[KASQAVSSAVA]	WYQQKP	
	* **** *	*	*	
hu2C8.vX	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQAVSSAVA]	WYQQKP	
		** ***		
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
quim.2C8	GQSPKLQIY [SASHRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	* *	
hu2C8.vX	GKAPKLLIY [SASHRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* ****			
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
quim.2C8	EDLAVYYC [QQHYSTPWT]	FGGGTKVEIKR (ID. SEC.NO:23)		
	* *	** *		
hu2C8.vX	EDFATYYC [QESYSTPWT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC.NO:102)		
		*** *		
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC.NO:40)		

FIG. 18A

Dominio Variable Pesado

	10	20	30	
quim.2C8	EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKAS	[GYTFTSYVIH]	WVKQK	
	** ** *	*	*	
hu2C8.vX	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYVIH]	WVRQA	
		* * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
quim.2C8	PGQGLEWIG [YNNPYNDGTNYNEKFKG]	KATLTSDKSSSTAYM		
	* *	*	** ** *	*
hu2C8.vX	PGKGLEWVG [YNNPYNAGTNYNEKFKG]	RFTISSDKSKNTAYL		
	* ***** *	****	* *	*
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
quim.2C8	ELSSLTSEDSAVYYCSR [PTMLPWF-AY]	WGQGTTLTVSA		
(ID. SEC NO:25)	*** ** *		** *	
hu2C8.vX	QMNSLRAEDTAVYYCSR [PTMLPWF-AY]	WGQGTTLTVSS		
(ID. SEC NO:103)				
		* *****		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS		
(ID. SEC NO:41)				

FIG. 18B

27/32

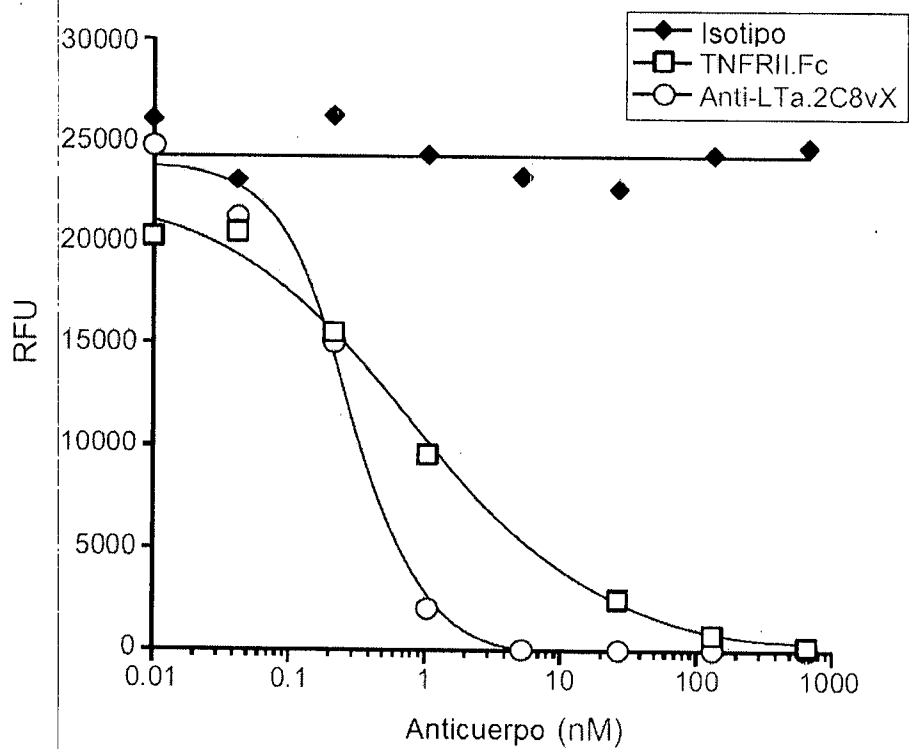


FIG. 20A

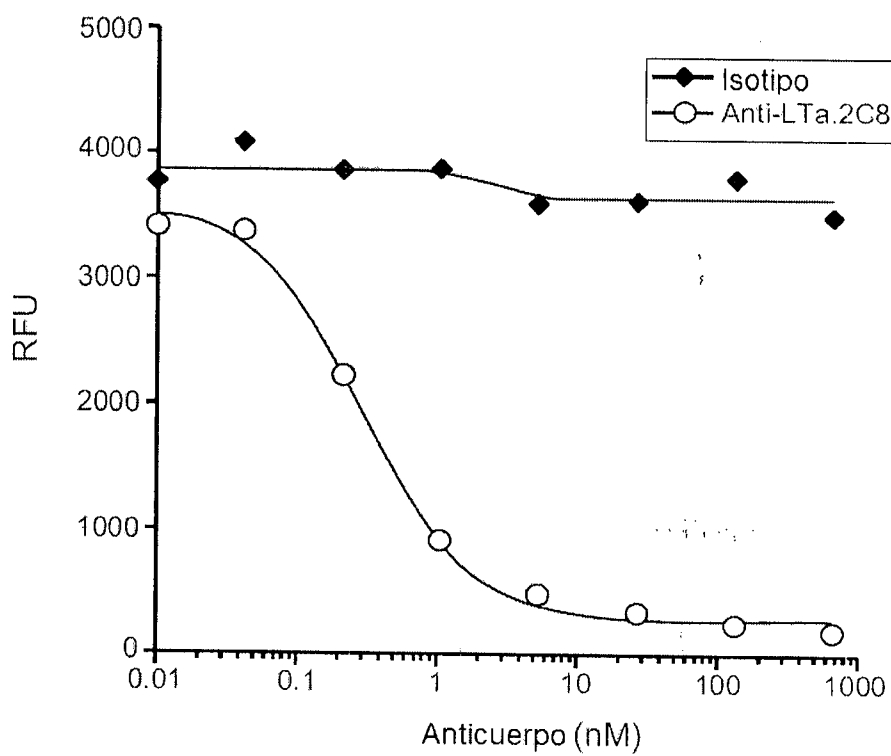


FIG. 20B

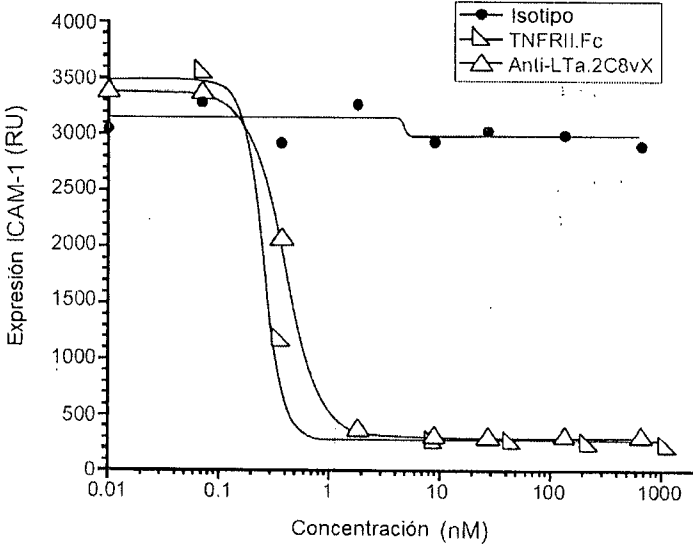


FIG. 21

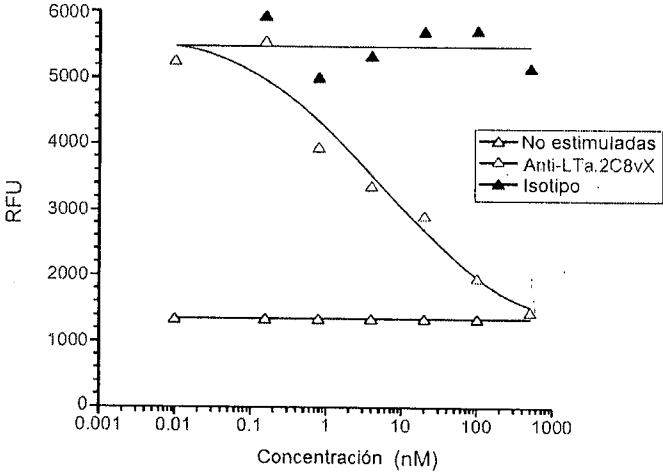


FIG. 22

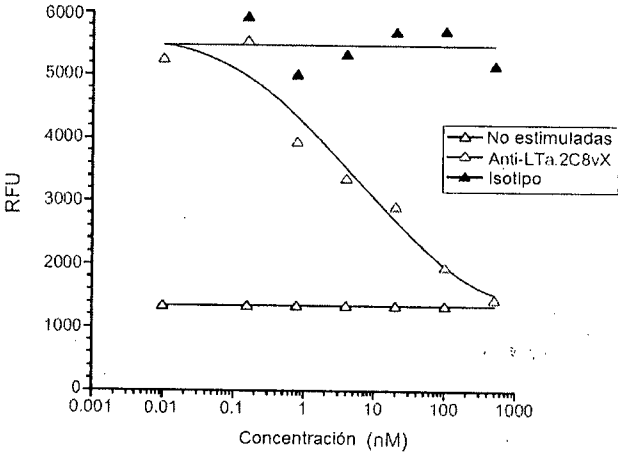


FIG. 22

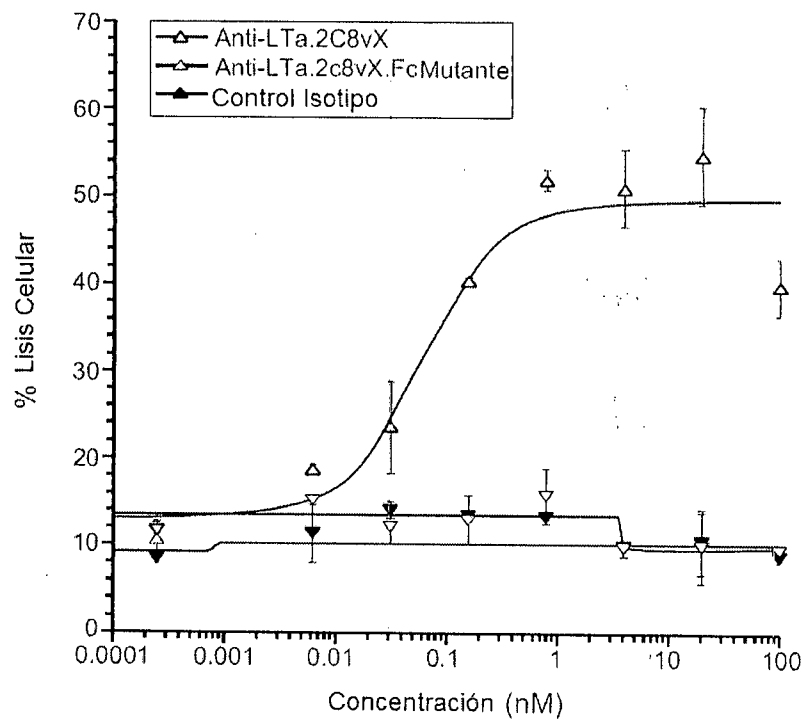


FIG. 23

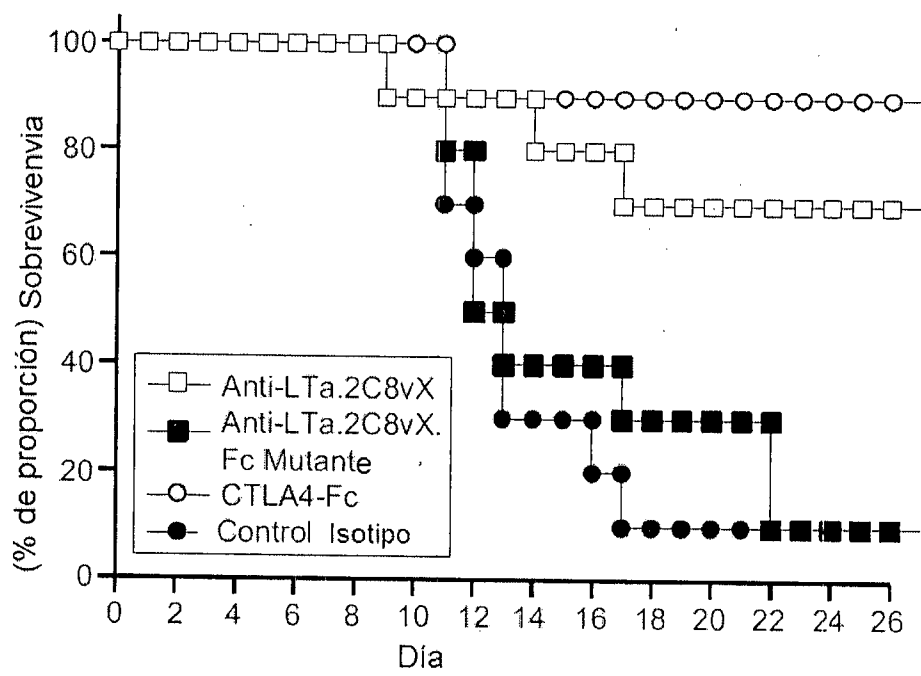


FIG. 24

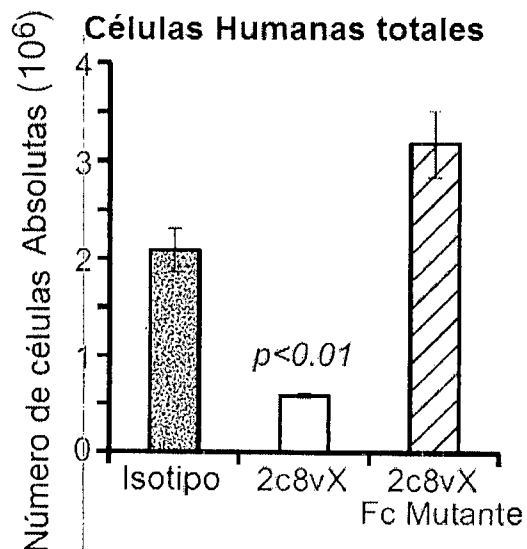


FIG. 25A

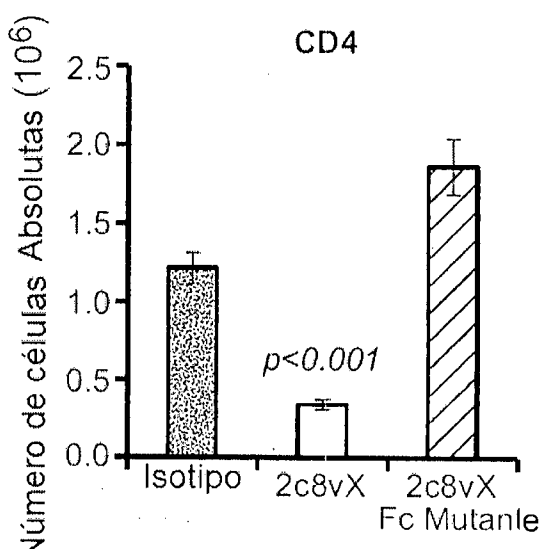


FIG. 25B

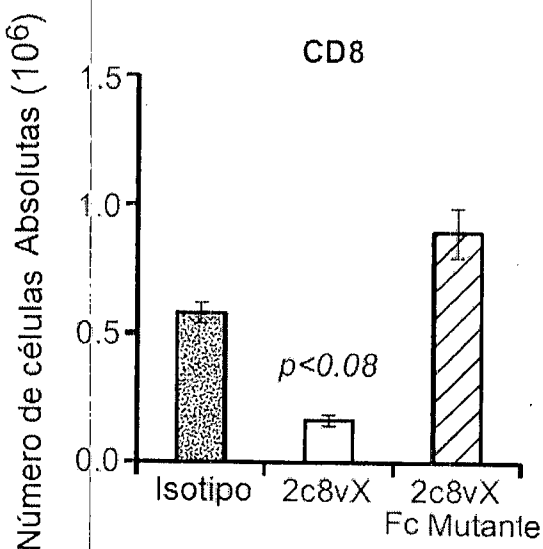


FIG. 25C

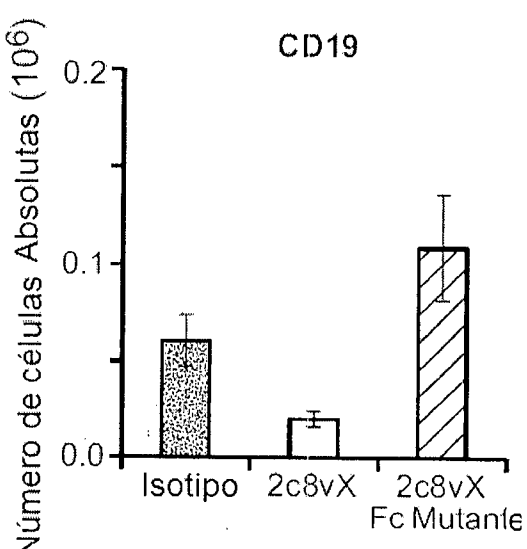


FIG. 25D

Cadena ligera Variable

	10	20	abcdef	30
3F12quim	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQOK	
	* *	** ** *		
3F12.v14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KSSQSLLYSTNQKNFLA]	WYQOK	
		**		
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQ-----SISNYLA]	WYQOK	
	40	50	60	70
3F12quim	PGQSPKLLIY [WASTRDS]	GVPDRFTGSGSGTDFTLT	TISSVKA	80
	**		* *	***
3F12.v14	PGKAPKLLIY [WASTRDS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	TISSLQP	
		* ***		
hum kI	PGKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	TISSLQP	
	90	100		
3F12quim	EDLAVYYC [QQYYSYPRT]	FGGGTKLEIKR (ID. SEC NO:27)		
	* *	* *		
3F12.v14	EDFATYYC [QQYYSYPRT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC NO:108)		
		* * *		
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR (ID. SEC NO:40)		

FIG. 26A

Cadena pesada Variable

	10	20	30	40
3F12quim	QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT	[GYTFSSYWIE]	WVKQR	
	** ** *	* ** *		* *
3F12.v14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GYTFSSYWIE]	WVRQA	
		*	***	
humhviii	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50	a	60	70
3F12quim	PGHGLEWIG [EISPGSGSTNYNEEFKG]	KATFTADKSSNTAYI		80
	* *	* *	* *	* *
3F12.v14	PGKGLEWVG [EINPGSGSTIYNEKFKG]	RATFSADNSKNTAYL		
	* * ****	* ****	* * *	*
humhviii	PGKGLEWVS [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
3F12quim	QLSSLSTEDSAVYYCAD [GYH-----GY]	WGQGTTLTVSS		
(ID. SEC NO:29)		** ** *	**	
3F12.v14	QMNSLRAEDTAVYYCAD [GYH-----GY]	WGQGTTLTVSS		
(ID. SEC NO:109)				
		* *****		
humhviii	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS		
(ID. SEC NO:41)				

FIG. 26B

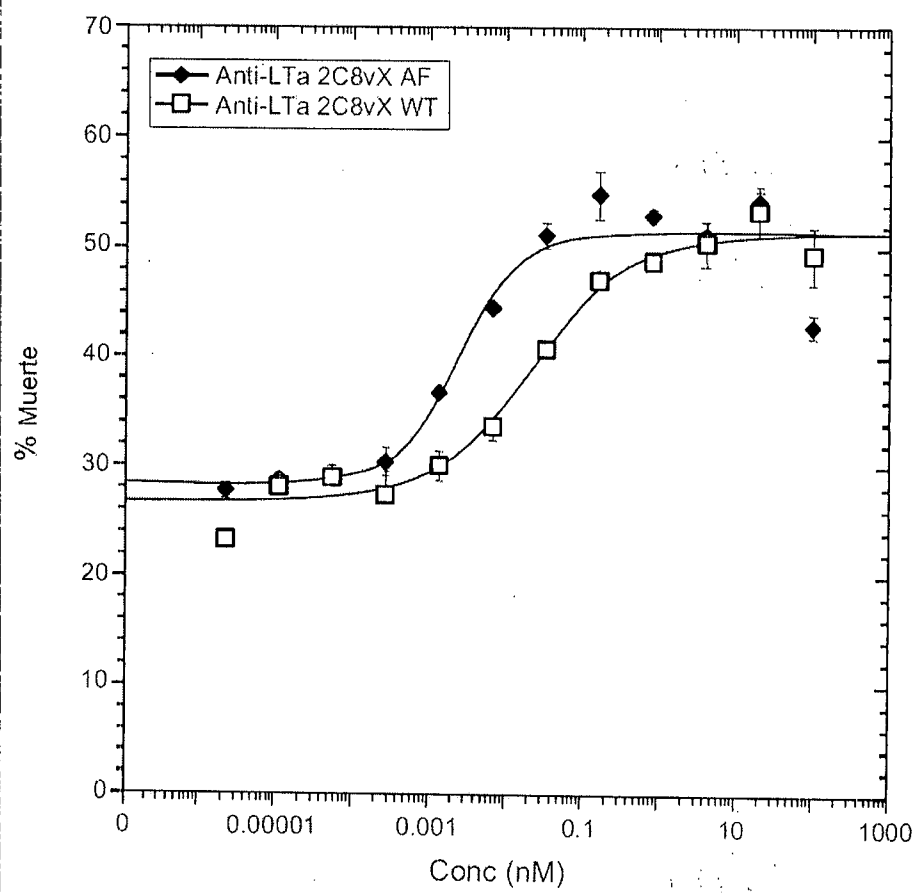


FIG. 27

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<110> Adams, Camellia W.
Grogan, Jane L.
Gurney, Austin L.
McCutcheon, Krista

<120> ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

<130> P2237R1 WO (1)

<141> 2007-10-11

<150> US 60/829,257

<151> 2006-10-12

<150> US 60/938,999

<151> 2007-05-18

<160> 110

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

<223> Sequence is synthesized

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala Val Ala
5 10

$\langle 210 \rangle$ 2

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

<223> Sequence is synthesized

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala Val Ala
5 10

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 11

<223> any amino acid

$\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 14

<223> any amino acid

<400> 3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Xaa Gln Lys Xaa Phe
1 5 10 15

Leu Ala

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> any amino acid

<220>
 <221> Xaa
 <222> 14
 <223> any amino acid

<400> 4
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ala Xaa Gln Lys Xaa Phe
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Xaa
 <222> 14
 <223> any amino acid

<400> 5
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Gln Lys Xaa Phe
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> any amino acid

<220>
 <221> Xaa
 <222> 14
 <223> any amino acid

<400> 6
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Xaa Gln Lys Xaa Ala
 1 5 10 15

Leu Ala

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 7
Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 8
Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser
5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 9
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 10
Gln Glu Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> xaa
<222> 3
<223> any amino acid

<400> 11
Gln Glu xaa Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 12

Gln Glu Val Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 13

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 14

Gln Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Arg Thr
5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 15

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Arg Thr
5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile His
5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 2-3

<223> any amino acid

<220>

<221> Unsure

<222> 2-3,6,10,12

<223> Unknown amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> any amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> any amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 12

<223> any amino acid

<400> 18

Tyr Xaa Xaa Pro Tyr Xaa Asp Gly Thr Xaa Tyr Xaa Glu Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> any amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 12

<223> any amino acid

<400> 19

Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Xaa Glu Glu Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 20
Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe Ala Tyr
5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 21
Gly Tyr His Gly Tyr
5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 22
Gly Tyr His Gly Ala
5

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 23
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser
20 25 30
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
35 40 45
Leu Gln Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 24

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

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

<210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

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

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

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

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 27	
Asp Ile Val	Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1	5 10 15
Gly Glu Lys	Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
	20 25 30
Tyr Ser Thr	Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
	35 40 45
Pro Gly Gln	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
	50 55 60
Asp Ser Gly	Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
	65 70 75
Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
	80 85 90
Val Tyr Tyr	Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
	95 100 105
Gly Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys Arg
	110

<210> 28
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 28	
Asp Ile Gln	Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1	5 10 15
Gly Asp Arg	Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
	20 25 30
Tyr Ser Thr	Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
	35 40 45

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 80 85 90
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
 95 100 105
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 29
 Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser
 65 70 75
 Ser Asn Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Ser Thr Ser Glu
 80 85 90
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp
 95 100 105
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
 110 115

<210> 30
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

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

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Asn Glu Glu Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp Gly
 95 100 105
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115

<210> 31
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 31
 Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser
 65 70 75
 Ser Asn Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Ser Thr Ser Glu
 80 85 90
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp
 95 100 105
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 32
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 32
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser
 20 25 30
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45
 Leu Gln Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

477

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

His Tyr Ser Thr	Pro Trp Thr Phe Gly	Gly Gly Thr Lys Val	Glu
95	100		105
Ile Lys Arg Thr	Val Ala Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe Pro	Pro
110	115		120
Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys	Leu
125	130		135
Leu Asn Asn Phe	Tyr Pro Arg Glu Ala	Lys Val Gln Trp Lys	Val
140	145		150
Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr	Glu
155	160		165
Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu	Thr
170	175		180
Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala Cys	Glu
185	190		195
Val Thr His Gln	Gly Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser Phe	Asn
200	205		210
Arg Gly Glu Cys			

<210> 33
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 33	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly	15
1	5	10
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	20	25
		30
Ser Tyr Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu	35	40
		45
Glu Trp Ile Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr	50	55
		60
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser	65	70
		75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp	80	85
		90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe	95	100
		105
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Ala Ser	110	115
		120
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser	125	130
		135
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	140	145
		150
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr	155	160
		165

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
170 175 180
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
185 190 195
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
200 205 210
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
215 220 225
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
320 325 330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
335 340 345
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
350 355 360
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
365 370 375
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
380 385 390
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
395 400 405
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
410 415 420
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
425 430 435
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 34
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 34
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

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

<210> 35
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

	95	100	105
Gly Gln Gly Thr	Thr Leu Thr Val Ser	Ser Ala Lys Thr Thr	Gly
	110	115	120
Pro Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser	Ser Lys Ser Thr Ser	Gly
	125	130	135
Gly Thr Ala Ala	Leu Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro	Glu
	140	145	150
Pro Val Thr Val	Ser Trp Asn Ser Gly	Ala Leu Thr Ser Gly	Val
	155	160	165
His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser	Ser Gly Leu Tyr Ser	Leu
	170	175	180
Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser	Ser Leu Gly Thr Gln	Thr
	185	190	195
Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val	Asp
	200	205	210
Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys	Pro
	215	220	225
Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly	Gly Pro Ser Val Phe	Leu
	230	235	240
Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu	Met Ile Ser Arg Thr	Pro
	245	250	255
Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro	Glu
	260	265	270
Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His Asn	Ala
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr Arg	Val
	290	295	300
Val Ser Val Leu	Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly	Lys
	305	310	315
Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys	Ala Leu Pro Ala Pro	Ile
	320	325	330
Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg Glu Pro	Gln
	335	340	345
Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu	Glu Met Thr Lys Asn	Gln
	350	355	360
Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile
	365	370	375
Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln	Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys
	380	385	390
Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu	Tyr
	395	400	405
Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg	Trp Gln Gln Gly Asn	Val
	410	415	420
Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr	Thr
	425	430	435
Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	Lys	
	440	445	

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 36
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 36
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
 80 85 90
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
 95 100 105
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 37
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
 20 25 30
 Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 35 40 45
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
 50 55 60
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr
 65 70 75
 Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr
 80 85 90
 His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn
 95 100 105
 Glu Cys

<210> 38
 <211> 114
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 38

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

<210> 39

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 39

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

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing
155 160 165

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

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

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

GENENLAW-#289564-V1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 41
 Glu val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp val Ser val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Gly Gly Gly Ser Asp
 95 100 105
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser Ala
 110 115

<210> 42
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala val Ser
 20 25 30
 Ser Ala val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr val Ala Ala Pro Ser val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser val val Cys Leu
 125 130 135

425

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 43
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe
 95 100 105
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115 120
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 125 130 135
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 140 145 150
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 155 160 165
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 170 175 180
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 185 190 195
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 200 205 210
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly Gly Pro Ser
215 230	220 225 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His Glu
260 265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val
275 280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu Pro
320 325	330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro Arg
335 340	345
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met Thr
350 355	360
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly Phe Tyr Pro
365 370	375
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn
380 385	390
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser Phe
395 400	405
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Gln
410 415	420
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu His Asn
425 430	435
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	Ser Pro Gly Lys
440 445	

<210> 44
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

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

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 45
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe
95 100 105

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115 120

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
140 145 150

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	155	160	165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	170	175	180
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	185	190	195
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	200	205	210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	215	220	225
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	275	280	285
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	305	310	315
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	320	325	330
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	335	340	345
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	350	355	360
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	365	370	375
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	380	385	390
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	395	400	405
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	410	415	420
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	425	430	435
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			440	445	

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 46

Glu val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 47
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> xaa
<222> 8
<223> any amino acid

<220>
<221> xaa
<222> 11
<223> any amino acid

<220>
<221> xaa
<222> 18
<223> any amino acid

<400> 48
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ser Lys Xaa Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 49
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> any amino acid

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> any amino acid

<220>
 <221> Xaa
 <222> 18
 <223> any amino acid

<400> 50
 Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Xaa Ser Lys Xaa Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ala Asp

<210> 51
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 51
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 52
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Gln Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 53
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 54
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 55
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 56
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> Unknown
<222> 15, 30
<223> R = A or G

<220>
<221> Unknown
<222> 18, 24, 27, 33
<223> N= A, G, C, and T

<220>
<221> Unknown
<222> 22
<223> Y = C or T

<400> 56
ggatcatcga tacarctngt vytncancar tcncc 35

<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> Unknown
<222> 3
<223> R = A or G

<220>
<221> Unknown
<222> 18
<223> Y = C or T

<400> 57
aarggtggta gaagactygc cgcgcggcaa tgg 33

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 58
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 58
 ggatccgata tccagctggt attgacccaa tct 33

<210> 59
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 59
 cccagcacac aaaaaccgtc gccatggact agg 33

<210> 60
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Unknown
 <222> 14, 24, 30
 <223> R = A or G

<220>
 <221> Unknown
 <222> 17, 27
 <223> N = A, G, C, and T

<400> 60
 tgataatcga tgargtncca tttrgtngar 30

<210> 61
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Unknown
 <222> 6
 <223> R = A or G

<220>
 <221> Unknown
 <222> 9, 12
 <223> N = A, G, C, and T

<400> 61
 accttragn cnaaggactg gtccgcgcgg aatgat 36

<210> 62
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 62
tgatcgcgta cgctgagggt caattggtg ag 32

<210> 63
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 63
ggcagaggag tcggtgttgt ttcccgggtg ctagt 35

<210> 64
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 64
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
95 100 105
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
110 115 120
Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
125 130 135
Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
140 145 150
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
155 160 165
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
170 175 180
Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His
185 190 195
Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
200 205 210
Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215 220

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<210> 65
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> xaa
<222> 59
<223> any amino acid

<220>
<221> xaa
<222> 61
<223> any amino acid

<220>
<221> xaa
<222> 77
<223> any amino acid

<220>
<221> xaa
<222> 157
<223> any amino acid

<400> 65
Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr
50 55 60
Xaa Glu Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Xaa Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Ser Thr Ser Glu
80 85 90
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
110 115 120
Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly
125 130 135
Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
140 145 150
Ser Val Thr Val Thr Trp Xaa Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val
155 160 165
His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser
170 175 180
Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
185 190 195
Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys

495

Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr
215 220

<210> 66

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 66

gctcatagtg accttttctc caacagacac agccagagat gatggcgact 50

gtgacatcac gatattgaa tgtactcc 78

<210> 67

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 67

gctgtaagtc cagtcaaagt cttttataca gtaccaatca gaagaacttc 50

ttggcctggt accagc 66

<210> 68

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 68

gcgatcaggg acaccagatt ccctagtgga tgccc 35

<210> 69

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 69

gccacgtctt cagcttttac actgctgatg g 31

<210> 70

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 70

ggccccccct ccgaacgtgc gcgggtagga gtagtattgc tgacagtaat 50

aaactgccag gtc 63

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

```

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 71
gctgcagctg accttctgaa tgtactcc 28

<210> 72
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 72
gccttgcagg agatcttcac tgaagcccca ggcttcatca gctcagctcc 50

<210> 73
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 73
cccactctat ccagtaacta gagaagggtg atccagtagc cttgcagg 48

<210> 74
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 74
ccacttccag gactaatctc tccaatccac tcaaggccat gtccaggcc 49

<210> 75
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 75
gcccttgaac tcctcattgt aattagtact accacttcca gg 42

<210> 76
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 76
ccgcagagtc ctcagatgtg atcaggctgc tgagctggat gtaggcagtg 50
ttggaggatt tgtctgcagt gaatgttgcc ttgcc 85

<210> 77
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

```

<223> Sequence is synthesized

<400> 77

ggctgaggag acggtgactg tggcgccttg gccccagtag ccatggtacc 50

cgtctgcaca gtaatagacc tc 72

<210> 78

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 78

ccagactgct gcagctgacc ttgtgaatgt actccagttg c 41

<210> 79

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Unknown

<222> 15

<223> R = A or G

<220>

<221> Unknown

<222> 21

<223> N = T, G, A or C

<400> 79

gccatagata tcgtratgca ncagtctc 28

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Unknown

<222> 15

<223> Y = C or T

<220>

<221> Unknown

<222> 18

<223> K = G or T

<400> 80

ccatggttcg acctytaktt t 21

<210> 81

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<220>

<221> Unknown

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<222> 20
 <223> Y = C or T

<220>
 <221> Unknown
 <222> 26
 <223> S = C or G

<400> 81
 gatcgacgta cgctgaggty cagctscagc tscagcagtc tgg 43

<210> 82
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<220>
 <221> Unknown
 <222> 3, 5, 18
 <223> R = A or G

<220>
 <221> Unknown
 <222> 4, 12
 <223> D = A or G or T

<220>
 <221> Unknown
 <222> 6
 <223> H = A or C or T

<220>
 <221> Unknown
 <222> 7
 <223> S = C or G

<220>
 <221> Unknown
 <222> 19
 <223> M = A or C

<400> 82
 tgrdrhsagt gdcagagrmg tcggaggtgg ttcccgggta gaca 44

<210> 83
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 83
 cctggtttct gttgatacca ggctacagcg gaagacacag cctgactggc 50
 acggcagg 58

<210> 84
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 84
 gcgagaaggg actccagtgt aacggtggga tgcagagtaa atctgtagtt 50

tcggagc 57

<210> 85
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 85
ggtaccctgt ccgaacgtcc aaggagtaga ataatgttgc tgacagtaat 50

aagttgc 57

<210> 86
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 86
ggtcagagtg aaatccgtcc cagatccgga tccagagaag cg 42

<210> 87
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 87
ggcctgacgg acccaatgga tcacatagct ggtgaatctg tagccagaag 50

ctgc 54

<210> 88
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 88
ccccttgaac ttctcgttat agttgggtgcc gtcgttataa ggattgttat 50

aaccaacca ctcgaggcc 69

<210> 89
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 89
ggttccttga cccagtagg cgaaccatgg gagcattgtg ggtcgagaac 50

aataatagac ggagtggtcc tcagc 75

<210> 90
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial sequence

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 90

ccgtcgttat aaggattgtt ataactaacc cactcgaggc c 41

<210> 91

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 91

catctgcagg tatagtgtgt ttttcgaatt gtcacgactg atagtgaagc 50

gcccccttgaa c 61

<210> 92

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 92

ccatgggagc attgtgggtc gagcacaata atagacggca gtgtcc 46

<210> 93

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 93

ggaagacttc gcaacttatt actgtcagca acattattct actccttgga 50

cgttcggaca gggtaccaag gtgg 74

<210> 94

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 94

ggacactgcc gtctattatt gttctcgacc cacaacgctc ccatggttcg 50

cctactgggg tcaaggaacc ctgg 74

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 95

Gln Glu His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

5

<210> 96

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 96
Gln Gln His Tyr Tyr Thr Pro Trp Thr
5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 97
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 98
Gln Lys Thr Phe Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 99
Gln Gln Phe Tyr Ser Val Pro Trp Thr
5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 100
Gln Gln Lys Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<220>
<221> xaa
<222> 2-3

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<223> any amino acid

<220>

<221> Unsure

<222> 2-3,6,10,12

<223> Unknown amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> any amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> any amino acid

<220>

<221> Xaa

<222> 12

<223> any amino acid

<400> 101

Tyr Xaa Xaa Pro Tyr Xaa Ala Gly Thr Xaa Tyr Xaa Glu Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 102

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser
20 25 30

Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
80 85 90

Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 103

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 103
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe
95 100 105
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 104
<211> 1704
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 104
gaagttcagc tggaggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc 50
actccgtttg tctgtgcag cttctggcta cacattcacc agctatgtga 100
tccattgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg ggttggttat 150
aacaatcctt ataacgccg caccaactat aacgagaagt tcaaggggcg 200
cttcactatc agttctgaca agtcgaaaaa cacagcatac ctgcagatga 250
acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tcgaccacaca 300
atgctcccat ggttcgcta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc 350
ctcagcctcc gaagttcagc tggaggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc 400
cagggggctc actccgtttg tctgtgcag cttctggcta cacattcacc 450
agctatgtga tccattgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg 500
ggttggttat aacaatcctt ataacgccg caccaactat aacgagaagt 550
tcaaggggcg cttcactatc agttctgaca agtcgaaaaa cacagcatac 600
ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc 650
tcgaccacaca atgctcccat ggttcgcta ctgggggtcaa ggaaccctgg 700
tcaccgtctc ctcagcctcc accaagggcc catcggtctt ccccttgga 750
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt 800
caaggactac tccccgaac cgtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc 850
tgaccagcgg cgtgcacacc tccccgctg tctacagtc ctcaggactc 900

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

tactccctca gcagcgtggt gactgtgccc tctagcagct tgggcacca 950
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca 1000
agaaagttga gccc aaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1050
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa 1100
accaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg 1150
tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 1200
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 1250
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 1300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agcctccca 1350
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 1400
acaggtgtac accctgcccc catcccgga agagatgacc agaaccagg 1450
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1500
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 1550
cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg 1600
acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1650
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg 1700
taaa 1704

<210> 105
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 105
gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga 50
tagggtcacc atcacctgcc gtgccagtca ggctgtgtct tccgctgtag 100
cctggtatca acagaaacca ggaaaagctc cgaaactact gatttactct 150
gcatcccacc gttacactgg agtcccttct cgcttctctg gatccggatc 200
tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg gaagacttcg 250
caacttatta ctgtcaggaa tcttattcta ctcttggaac gttcggacag 300
ggtaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat 350
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt 400
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 450
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag 550
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 106

905

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized

<400> 106

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

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
320 325 330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
335 340 345
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
350 355 360
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
365 370 375
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
380 385 390
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
395 400 405
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
410 415 420
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
425 430 435
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 107
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser
20 25 30
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
80 85 90
Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

GENENLAW-#289564-v1-P2237R1_WO_(1)_corrected_sequence_listing

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 108
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 108
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 80 85 90
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
 95 100 105
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 109
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized

<400> 109
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp Gly
95 100 105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 3
<223> any amino acid

<220>
<221> Xaa
<222> 12
<223> any amino acid

<400> 110
Glu Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Xaa Glu Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

LISTA-SEC-0808-0018-ESP
Lista de secuencias

<110> Adams, Camellia W.
Grogan, Jane L.
Gurney, Austin L.
McCutcheon, Krista

<120> ANTICUERPOS PARA LINFOTOXINA-ALFA

<130> P2237R1 WO (1)

<141> 2007-10-11

<150> US 60/829,257

<151> 2006-10-12

<150> US 60/938,999

<151> 2007-05-18

<160> 110

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala Val Ala
5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala Val Ala
5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 11

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> 14

<223> cualquier aminoácido

<400> 3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Xaa Gln Lys Xaa Phe
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 11

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> 14

<223> cualquier aminoácido

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ala Xaa Gln Lys Xaa Phe
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 14

<223> cualquier aminoácido

<400> 5

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Gln Lys Xaa Phe
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 11

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> 14

<223> cualquier aminoácido

<400> 6

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Xaa Gln Lys Xaa Ala
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 7

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 8

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser

5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 9
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 10
Gln Glu Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 3
<223> cualquier aminoácido

<400> 11
Gln Glu Xaa Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 12
Gln Glu Val Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 13
Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 14
Gln Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Arg Thr
5

<210> 15
<211> 9

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> cualquier aminoácido

<220>
<221> Xaa
<222> 12
<223> cualquier aminoácido

<400> 19
Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Xaa Glu Glu Phe
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 20
Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe Ala Tyr
5

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

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 21
Gly Tyr His Gly Tyr
5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 22
Gly Tyr His Gly Ala
5

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 23
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser
20 25 30
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
35 40 45
Leu Gln Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

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

Ile Lys Arg

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

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

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 26

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

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

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 27
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
 80 85 90
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
 95 100 105
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 28
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
80 85 90
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
95 100 105
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 29
Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Glu Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Asn Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Ser Thr Ser Glu
80 85 90
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
110 115

<210> 30
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

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

<210> 31
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<223> Secuencia sintetizada

<400> 31

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

<210> 32

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 32

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

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<210> 33
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 33
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe
95 100 105
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Ala Ser
110 115 120
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
125 130 135
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
140 145 150
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
155 160 165
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
170 175 180
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
185 190 195
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
200 205 210
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
215 220 225
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
320 325 330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
335 340 345
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
350 355 360

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 365 370 375
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 380 385 390
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 395 400 405
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 410 415 420
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 425 430 435
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 34
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 34
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
 80 85 90
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
 95 100 105
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 110 115 120
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 125 130 135
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 140 145 150
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 155 160 165
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 170 175 180
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 185 190 195
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 200 205 210
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215 220

<210> 35
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 35

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Glu	Glu	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Ile	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Glu	
				80					85					90	
Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Asp	Gly	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	
				95					100					105	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	
				110					115					120	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
				125					130					135	
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				140					145					150	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
				155					160					165	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
				170					175					180	
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
				185					190					195	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
				200					205					210	
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
				215					220					225	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
				230					235					240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
				260					265					270	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
				275					280					285	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
				290					295					300	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				305					310					315	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				320					325					330	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				335					340					345	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
				350					355					360	
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
				365					370					375	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				380					385					390	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
				395					400					405	

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
410 415 420

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
425 430 435

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 36
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60

Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
95 100 105

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
110

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 37
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
35 40 45

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
50 55 60

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr
65 70 75

Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr
80 85 90

His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn
95 100 105

Glu Cys

<210> 38
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<223> Secuencia sintetizada

<400> 38

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

<210> 39

<211> 335

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 39

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

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
230 235 240

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr
245 250 255

Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
260 265 270

Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro
275 280 285

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn
290 295 300

Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
305 310 315

Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile
320 325 330

Ser Arg Ser Pro Gly
335

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Lys Asn Thr Leu Tyr 80 Leu Gln Met Asn Ser 85 Leu Arg Ala Glu Asp 90
Thr Ala Val Tyr Tyr 95 Cys Ala Arg Gly Arg 100 Gly Gly Gly Ser Asp 105
Tyr Trp Gly Gln Gly 110 Thr Leu Val Thr Val 115 Ser Ser Ala

<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 42
Asp 1 Ile Gln Met Thr 5 Gln Ser Pro Ser 10 Ser Leu Ser Ala Ser Val 15
Gly Asp Arg Val 20 Thr Ile Thr Cys Arg Ala 25 Ser Gln Ala Val Ser 30
Ser Ala Val Ala Trp 35 Tyr Gln Gln Lys Pro 40 Gly Lys Ala Pro Lys 45
Leu Leu Ile Tyr 50 Ser Ala Ser His Arg Tyr 55 Thr Gly Val Pro Ser 60
Arg Phe Ser Gly 65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp 70 Phe Thr Leu Thr Ile 75
Ser Ser Leu Gln 80 Pro Glu Asp Phe Ala Thr 85 Tyr Tyr Cys Gln Gln 90
His Tyr Ser Thr 95 Pro Trp Thr Phe Gly Gln 100 Gly Thr Lys Val Glu 105
Ile Lys Arg Thr 110 Val Ala Ala Pro Ser Val 115 Phe Ile Phe Pro Pro 120
Ser Asp Glu Gln 125 Leu Lys Ser Gly Thr Ala 130 Ser Val Val Cys Leu 135
Leu Asn Asn Phe 140 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 145 Val Gln Trp Lys Val 150
Asp Asn Ala Leu 155 Gln Ser Gly Asn Ser Gln 160 Glu Ser Val Thr Glu 165
Gln Asp Ser Lys 170 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 175 Ser Ser Thr Leu Thr 180
Leu Ser Lys Ala 185 Asp Tyr Glu Lys His Lys 190 Val Tyr Ala Cys Glu 195
Val Thr His Gln 200 Gly Leu Ser Ser Pro Val 205 Thr Lys Ser Phe Asn 210
Arg Gly Glu Cys

<210> 43
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 43
Glu 1 Val Gln Leu Val 5 Glu Ser Gly Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly 15
Gly Ser Leu Arg Leu 20 Ser Cys Ala Ala Ser 25 Gly Tyr Thr Phe Thr 30
Ser Tyr Val Ile His 35 Trp Val Arg Gln Ala 40 Pro Gly Lys Gly Leu 45

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Asn	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Asn	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Pro	Thr	Met	Leu	Pro	Trp	Phe	
				95					100					105	
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	
				110					115					120	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
				125					130					135	
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				140					145					150	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
				155					160					165	
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
				170					175					180	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				185					190					195	
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
				200					205					210	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	
				215					220					225	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
				230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
				275					280					285	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
				290					295					300	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				305					310					315	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
				320					325					330	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
				335					340					345	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	
				350					355					360	
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
				365					370					375	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				380					385					390	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
				395					400					405	
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
				410					415					420	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
				425					430					435	
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
				440					445						

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<210> 44
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 44
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser
 20 25 30
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 45
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

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

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Pro	Thr	Met	Leu	Pro	Trp	Phe
			95						100					105
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
			110						115					120
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
			125						130					135
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			140						145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
			155						160					165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
			170						175					180
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
			185						190					195
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			200						205					210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
			215						220					225
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
			230						235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260						265					270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			275						280					285
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
			290						295					300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
			305						310					315
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
			320						325					330
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
			335						340					345
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
			350						355					360
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
			365						370					375
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			380						385					390
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			395						400					405
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			410						415					420
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			425						430					435
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			440						445					

- <210> 46
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <400> 46

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 47
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> cualquier aminoácido

<220>
<221> Xaa
<222> 11
<223> cualquier aminoácido

<220>
<221> Xaa
<222> 18
<223> cualquier aminoácido

<400> 48
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ser Lys Xaa Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 49
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> cualquier aminoácido

<220>
<221> Xaa
<222> 11
<223> cualquier aminoácido

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<220>
 <221> Xaa
 <222> 18
 <223> cualquier aminoácido
 <400> 50
 Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Xaa Ser Lys Xaa Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Xaa Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala Asp

<210> 51
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 51
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 52
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Gln Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 53
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Cys

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 54
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 55

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

- <210> 56
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <220>
- <221> Desconocida
- <222> 15, 30
- <223> R = A or G
- <220>
- <221> Desconocida
- <222> 18, 24, 27, 33
- <223> N= A, G, C, and T
- <220>
- <221> Desconocida
- <222> 22
- <223> Y = C or T
- <400> 56
ggatcatcga tacarctngt vytncancar tcncc 35
- <210> 57
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <220>
- <221> Desconocida
- <222> 3
- <223> R = A or G
- <220>
- <221> Desconocida
- <222> 18
- <223> Y = C or T
- <400> 57
aarggtggta gaagactygc cgcgcgga tgg 33
- <210> 58
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <400> 58
ggatccgata tccagctggt attgacccaa tct 33
- <210> 59
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <400> 59
cccagcacac aaaaaccgtc gccatggact agg 33
- <210> 60
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintetizada
- <220>

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<221> Desconocida
<222> 14, 24, 30
<223> R = A or G

<220>
<221> Desconocida
<222> 17, 27
<223> N = A, G, C, and T

<400> 60
tgataatcga tgargtncca ttttrgtngar 30

<210> 61
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Desconocida
<222> 6
<223> R = A or G

<220>
<221> Desconocida
<222> 9, 12
<223> N = A, G, C, and T

<400> 61
accttragnc cnagggactg gtccgcgcgg aatgat 36

<210> 62
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 62
tgatcgcgta cgctgaggtt caattggttg ag 32

<210> 63
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 63
ggcagaggag tcggtgttgt ttcccgggtg ctagt 35

<210> 64
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 64
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly
				95					100					105
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr
				110					115					120
Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly
				125					130					135
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile
				140					145					150
Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val
				155					160					165
Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
				170					175					180
Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His
				185					190					195
Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro
				200					205					210
Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys					
				215					220					

<210> 65
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<220>
 <221> Xaa
 <222> 59
 <223> cualquier aminoácido

<220>
 <221> Xaa
 <222> 61
 <223> cualquier aminoácido

<220>
 <221> Xaa
 <222> 77
 <223> cualquier aminoácido

<220>
 <221> Xaa
 <222> 157
 <223> cualquier aminoácido

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

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly
125 130 135

Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
140 145 150

Ser Val Thr Val Thr Trp Xaa Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val
155 160 165

His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser
170 175 180

Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
185 190 195

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys
200 205 210

Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr
215 220

<210> 66
<211> 78
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 66
gctcatagtg accttttctc caacagacac agccagagat gatggcgact 50
gtgacatcac gatatctgaa tgtactcc 78

<210> 67
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 67
gctgtaagtc cagtcaaagt cttttataca gtaccaatca gaagaacttc 50
ttggcctggt accagc 66

<210> 68
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 68
gcgatcaggg acaccagatt ccctagtgga tgccc 35

<210> 69
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 69
gccacgtctt cagcttttac actgctgatg g 31

<210> 70
<211> 63
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 70
ggtccccct ccgaacgtgc gcgggtagga gtagtattgc tgacagtaat 50
aaactgccag gtc 63

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<210> 71
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 71
gctgcagctg accttctgaa tgtactcc 28

<210> 72
<211> 50
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 72
gccttgagg agatcttcac tgaagcccca ggcttcatca gctcagctcc 50

<210> 73
<211> 48
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 73
ccactctat ccagtaacta gagaagggtgt atccagtagc cttgcagg 48

<210> 74
<211> 49
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 74
ccacttccag gactaatctc tccaatccac tcaaggccat gtccaggcc 49

<210> 75
<211> 42
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 75
gcccttgaac tcctcattgt aattagtact accacttcca gg 42

<210> 76
<211> 85
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 76
ccgcagagtc ctcagatgtg atcaggctgc tgagctggat gtaggcagtg 50
ttggaggatt tgtctgcagt gaatgttgcc ttgcc 85

<210> 77
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 77
ggctgaggag acggtgactg tgggtgccttg gcccagtag ccatgggtacc 50
cgtctgcaca gtaatagacc tc 72

```

<210> 78
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 78
ccagactgct gcagctgacc ttgtgaatgt actccagttg c 41

<210> 79
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Desconocida
<222> 15
<223> R = A or G

<220>
<221> Desconocida
<222> 21
<223> N = T, G, A or C

<400> 79
gccatagata tcgtratgca ncagtctc 28

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Desconocida
<222> 15
<223> Y = C or T

<220>
<221> Desconocida
<222> 18
<223> K = G or T

<400> 80
ccatggttcg acctytaktt t 21

<210> 81
<211> 43
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Desconocida
<222> 20
<223> Y = C or T

<220>
<221> Desconocida
<222> 26
<223> S = C or G

<400> 81
gatcgacgta cgctgaggtty cagctscagc tscagcagtc tgg 43

<210> 82
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

```

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Desconocida

<222> 3, 5, 18

<223> R = A or G

<220>

<221> Desconocida

<222> 4, 12

<223> D = A or G or T

<220>

<221> Desconocida

<222> 6

<223> H = A or C or T

<220>

<221> Desconocida

<222> 7

<223> S = C or G

<220>

<221> Desconocida

<222> 19

<223> M = A or C

<400> 82

tgrdrhsagt gdcagagrmg tcggaggtgg ttcccgggta gaca 44

<210> 83

<211> 58

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 83

cctggtttct gttgatacca ggctacagcg gaagacacag cctgactggc 50

acggcagg 58

<210> 84

<211> 57

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 84

gcgagaaggg actccagtgt aacggtggga tgcagagtaa atctgtagtt 50

tcggagc 57

<210> 85

<211> 57

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 85

ggtaccctgt ccgaacgtcc aaggagtaga ataatgttgc tgacagtaat 50

aagttgc 57

<210> 86

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 86

ggtcagagtg aaatccgtcc cagatccgga tccagagaag cg 42

<210> 87

537

<211> 54
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 87
ggcctgacgg acccaatgga tcacatagct ggtgaatctg tagccagaag 50
ctgc 54

<210> 88
<211> 69
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 88
ccccttgaac ttctcgttat agttgggtgcc gtcgttataa ggattgttat 50
aaccaacca ctcgaggcc 69

<210> 89
<211> 75
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 89
ggttccttga ccccgatagg cgaaccatgg gagcattgtg ggtcgagaac 50
aataatagac ggcagtgtcc tcagc 75

<210> 90
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 90
ccgtcgttat aaggattgtt ataactaacc cactcgaggc c 41

<210> 91
<211> 61
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 91
catctgcagg tatagtgtgt ttttcgaatt gtcacgactg atagtgaagc 50
gccccttgaa c 61

<210> 92
<211> 46
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 92
ccatgggagc attgtgggtc gagcacaata atagacggca gtgtcc 46

<210> 93
<211> 74
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<400> 93
 ggaagacttc gcaacttatt actgtcagca acattattct actccttgga 50
 cgttcggaca gggtagcaag gtgg 74

<210> 94
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 94
 ggacactgcc gtctattatt gttctcgacc cacaacgctc ccatgggttcg 50
 cctactgggg tcaaggaacc ctgg 74

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 95
 Gln Glu His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 5

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 96
 Gln Gln His Tyr Tyr Thr Pro Trp Thr
 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 97
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 5

<210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 98
 Gln Lys Thr Phe Ser Thr Pro Trp Thr
 5

<210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 99
 Gln Gln Phe Tyr Ser Val Pro Trp Thr
 5

<210> 100
 <211> 9
 <212> PRT

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 100

Gln Gln Lys Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<220>

<221> Xaa

<222> 2-3

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> inseguro

<222> 2-3,6,10,12

<223> aminoácido desconocido

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> cualquier aminoácido

<220>

<221> Xaa

<222> 12

<223> cualquier aminoácido

<400> 101

Tyr Xaa Xaa Pro Tyr Xaa Ala Gly Thr Xaa Tyr Xaa Glu Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada

<400> 102

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

Ile Lys Arg

940

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

<210> 103
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 103
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 15
 1 5 10
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 30
 20 25
 Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 45
 35 40
 Glu Trp Val Gly Tyr Asn Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Asn Tyr 60
 50 55
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser 75
 65 70
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 90
 80 85
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Met Leu Pro Trp Phe 105
 95 100
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115
 110 115

<210> 104
 <211> 1704
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada

<400> 104
 gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc 50
 actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cacattcacc agctatgtga 100
 tccattgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg gggttggttat 150
 aacaatcctt ataacgccg caccaactat aacgagaagt tcaaggggcg 200
 cttcactatc agttctgaca agtcgaaaaa cacagcatac ctgcagatga 250
 acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tcgaccaca 300
 atgctcccat gggtcgcta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc 350
 ctgagcctcc gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc 400
 cagggggctc actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cacattcacc 450
 agctatgtga tccattgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg 500
 gggttggttat aacaatcctt ataacgccg caccaactat aacgagaagt 550
 tcaaggggcg cttcactatc agttctgaca agtcgaaaaa cacagcatac 600
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc 650
 tcgaccaca atgctcccat gggtcgcta ctgggggtcaa ggaaccctgg 700
 tcaccgtctc ctgagcctcc accaagggcc catcggtctt ccccttgga 750
 cctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt 800
 caaggactac ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc 850
 tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctgaggactc 900
 tactcctca gcagcgtggt gactgtgccc tctagcagct tgggcacca 950

SA

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca 1000
agaaagttag gccc aaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 1050
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaaa 1100
acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgagggtc acatgcgtgg 1150
tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 1200
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 1250
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 1300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1350
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 1400
acaggtgtac accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg 1450
tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1500
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 1550
cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg 1600
acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1650
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg 1700
taaa 1704

<210> 105
<211> 642
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 105
gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga 50
tagggtcacc atcacctgcc gtgccagtca ggctgtgtct tccgctgtag 100
cctggtatca acagaaacca ggaaaagctc cgaaactact gatttactct 150
gcatccacc gttacactgg agtcccttct cgcttctctg gatccggatc 200
tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg gaagacttcg 250
caacttatta ctgtcaggaa tcttattcta ctcttggac gttcggacag 300
ggtagcaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat 350
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt 400
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 450
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag 550
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 106
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 106
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Ser	Tyr	Val	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Asn	Asn	Pro	Tyr	Asn	Ala	Gly	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60
Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Pro	Thr	Met	Leu	Pro	Trp	Phe
				95					100					105
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
				125					130					135
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				140					145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
				155					160					165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				170					175					180
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
				185					190					195
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
				200					205					210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				215					220					225
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
				275					280					285
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				290					295					300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				305					310					315
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				320					325					330
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				335					340					345
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
				350					355					360
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
				365					370					375
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				380					385					390
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
				395					400					405
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				410					415					420
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				425					430					435

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

- <210> 107
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Secuencia sintetizada

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Val Ser
20 25 30
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
80 85 90
Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

- <210> 108
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Secuencia sintetizada

<400> 108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30
Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

LISTA-SEC-0808-0018-ESP

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
80 85 90
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly
95 100 105
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 109
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<400> 109
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ile Tyr
50 55 60
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Asn Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Tyr His Gly Tyr Trp Gly
95 100 105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 3
<223> cualquier aminoácido

<220>
<221> Xaa
<222> 12
<223> cualquier aminoácido

<400> 110
Glu Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Xaa Glu Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

110323
545

ATCC

10881 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Genentech, Inc.
Attn: Janet Hasak
1 DNA Way MS 49
South San Francisco, CA 94080

Deposited on Behalf of: Genentech, Inc.

Identification Reference by Depositor:

Patent Deposit Designation

Hybridoma Cell Line from Armenian Hamster: murine Lymphotoxin
Alpha2 beta1 sH3.2.2
(Docket or Case No: PR2237)

PTA-7538

The deposit was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received April 12, 2006 by this International Depository Authority and has been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested June 8, 2006. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Mari Harris
Mari Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: July 29, 2006

110323
SAB

RECEIVED
APR 10 2008
GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/081154

PG/JH/CK

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 27 March 2008 (27.03.2008)	To: HASAK, Janet E. Genentech, Inc. MS 49 1 DNA Way South San Francisco, California 94080 ETATS-UNIS D'AMERIQUE	
Applicant's or agent's file reference P2237R1		IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/081154		International filing date (day/month/year) 11 October 2007 (11.10.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published		Priority date (day/month/year) 12 October 2006 (12.10.2006)
Applicant GENENTECH, INC. et al		

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
12 October 2006 (12.10.2006)	60/829,257	US	08 March 2008 (08.03.2008)
18 May 2007 (18.05.2007)	60/938,999	US	08 March 2008 (08.03.2008)

De-docketed

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Yoshiko Kuwahara e-mail PT07.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 07
---	--

glt

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JAN 05 2009

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

To:
Genentech, Inc.
Attn. Hasak, Janet E.
1 DNA Way MS-49
South San Francisco CA 94080-4990
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

CALENDARED/LS
Respond to ISR Deadline / consider Chap II (PCT Rule 44.1)
28 FEB 09

Date of mailing
(day/month/year) 30/12/2008

Applicant's or agent's reference P2237R1	DUE DATE Respond to Written Opinion	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2007/081154	Chapter II Deadline 30 MAR 09	International filing date (day/month/year) 11/10/2007
Applicant GENENTECH, INC.		

CALENDARED/LS
IDS Due (PCT Search Report)
30 Day Deadline
4 FEB 09

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sabina Maretto
--	--------------------------------------

PATENT COOPERATION TREATY
PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2237R1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/081154	International filing date (day/month/year) 11/10/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/10/2006
Applicant GENENTECH, INC.		

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 7 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
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b/s(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

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 No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4A, 4B
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/081154

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material

☒ on paper

☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing

☒ contained in the international application as filed

☒ filed together with the international application in electronic form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

550

International application No PCT/US2007/081154	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 A61K39/395 A61P37/06 ADD. C07K14/525	
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) C07K A61K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	IMAGAWA D K ET AL: "Anti-tumor necrosis factor antibody enhances allograft survival in rats" JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CA, US, vol. 48, no. 4, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 345-348, XP023309844 ISSN: 0022-4804 [retrieved on 1990-04-01] page 346 table 1 1-25, 29-35, 59-62, 65-69
X	WO 2005/067477 A (CENTOCOR INC [US]; GILES-KOMAR JILL [US]; SCALLON BERNARD J [US]; CAI) 28 July 2005 (2005-07-28) example 2 1-25, 29-35, 59-62, 65-69
----- -/-	
☒ 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 document but 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. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 December 2008	Date of mailing of the international search report 30/12/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bumb, Peter

591

International application No
PCT/US2007/081154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FAVA ROY A ET AL: "A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 JUL 2003, vol. 171, no. 1, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 115-126, XP002508121 ISSN: 0022-1767 the whole document	70-102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/081154

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a):

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

- 1. claims: 1-30, 36-62, 65-102 (all in part), 32, 34 (both complete)

Anti-LTalpha antibodies comprising at least one CDR derived from mAb 2C8 or a variant-antibody thereof, namely comprising at least one of SEQ ID Nos: 1-2, 7, 9, 11, 16, 18, 20, 101, 23-26, 102, 103.

- 2. claims: 1-30, 36-62, 65-102 (all in part), 33, 35 (both complete)

Anti-LTalpha antibodies comprising at least one CDR derived from mAb 3F12 or a variant-antibody thereof, namely comprising at least one of SEQ ID Nos: 3, 4, 5, 8, 13-15, 17, 19, 21, 22, 110, 27-31, 108, 109.

- 3. claims: 63-64 (both complete)

Anti-LTalpha antibody S5H3, corresponding hybridoma cell line.

554

Information on patent family members				International application No	
Patent document cited in search report				PCT/US2007/081154	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2005067477 A		28-07-2005	EP 1699486 A2		13-09-2006

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2007/081154

The particular technical efficacy of a classical antibody resides in the precise three-dimensional structure of its complete antigen-binding region and thus relies on 3 CDRs being correctly positioned in space by four FR-regions per VH and per VL domain (thus 6 CDRs and 8 FR in total). Partial structural features of a reference antibody thus only describe partial effectiveness thereof and thus do not describe any particular technical effect as such. In other words, the subject-matter of claims 1-7, 32-35 does not comprise all essential technical/structural features of an antibody.

As no particular technical effects results explicitly or inherently from the partially/structurally defined mAbs of claims 1-7, 32-35 the technical problem to be solved is thus the provision of alternative LTalpha-neutralizing antibodies.

The provision of alternative antibodies that reproduce a previously described inhibitory effect may be achieved by routine techniques. The subject-matter of **claims 1-7, 32-35** does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

- 3.3** The same argumentation as above applies to the subject-matter of **claims 8-11** with respect to only partial structural features (Article 33(3) PCT).
- 3.4** The neutralizing anti-human LTALPHA pAb of D1 does not differ from the (implicitly neutralizing) pAb of the underlying application from which neutralizing mAbs 2C8 and 3F12 were selected. As said pAb of D1 is antagonistic and blocks proinflammatory signalling it must either block LTalpha3/TNFR1/II or LTalpha1beta2/LTbetaR interaction or both. The functional criteria of claims 12-16 thus are indeed inherent to the pAb of D1. The same applies to the functional criteria of claims 17-18 which are inherent to full-length/ADCC-competent antibodies, as those of D1. The same argumentation as for claims 1-7, 32-35 thus still applies to the subject-matter of **claims 12-18** (Article 33(3) PCT).
- 3.5** Humanization/chimerization is routinely practised in the art and as such does not provide any unexpected technical effect. The subject-matter of **claims 19-**

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2007/081154

21 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

- 3.6** A particularly high affinity of at least 10^{-12} M ($KD < 1$ pM) has not been previously reported. The underlying application does not disclose any antibody that achieves such a high affinity. The subject-matter of **claim 22** thus is speculative over the entire scope claimed and does not provide a technical solution in the sense of Article 33(3) PCT.
- 3.7** The pAb of D1 is of wildtype IgG isotype (see D1; p. 346, left column). IgG1 and IgG2a are routinely chosen in the art as antibody format, also in context of anti-human LTalpha mAbs (see D2; p. 77). the subject-matter of **claims 23-25** does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.8** The additional technical features of claims 26-28, 36-58 decrease fucosylation of the claimed antibodies (see description; p. 99, ll. 5 to p. 100, l. 25) and increase effector-functions thereof. ADCC is involved in mediating anti-inflammatory effects of the claimed antibodies (see present examples 9 & 16). Said Fc-modifications thus may be expected to improve anti-inflammatory efficacy. The technical problem to be solved with respect to D1 is thus the provision of anti-inflammatory anti-LTalpha antibodies with improved efficacy.
- Since the anti-inflammatory efficacy of anti-LTalpha antibodies was not previously known to be associated to ADCC, the person skilled in the art would not have modified FC-regions of such antibodies to solve the abovementioned technical problem. The subject-matter of claims **26-28, 36-58** involves an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.9** Claims 29-31 make reference to an affinity for human LTalpha which is supposedly better than that achieved by anti-murine LTalpha mAb S5H3. The underlying application does not demonstrate that S5H3 binds to human LTalpha, let alone with which affinity it would do so. **Claims 29-31** thus do not define any particular technical effect and its subject-matter does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2007/081154

- 3.10** The provision of anti-idiotypic antibodies is routinely practised in the art. The subject-matter of **claim 59** does not provide any particular or unexpected technical effect and does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.11** The anti-inflammatory/immunosuppressive effect of anti-human LTalpha antibodies has already been demonstrated in D1. In view of this the addition of further anti-inflammatory/immunosuppressive compounds only leads to further expected therapeutic effects. The subject-matter of **claims 60-62** does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.12** Claims 65-68 do not introduce any technical features over the subject-matter of claim 1 that go beyond the application of routine techniques. The subject-matter of **claims 65-68** does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.13** Transplant rejection as per D1 is an immunesystem-mediated/lymphocyte mediated disorder. It is immediately obvious to the skilled artisan that neutralizing anti-LTalpha antibodies will have an anti-proliferative effect. The subject-matter of claim 69 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.14** An autoimmune disorders has not been previously treated by means of anti-LTalpha antibodies. The technical problem to be solved by the subject-matter of claims 70-94 is the provision of a medicament effective in treating such disorders. This technical problem has been solved in the underlying application (see examples 4-6).

The LTalpha1beta2/LIGHT/LTbetaR-axis has previously been implicated in the development of autoimmune disorders such as collagen-induce arthritis (see D3; p. 116, left column).

However, since two ligands exist for the one receptor it was not evident to the skilled artisan that blockage of one ligand or ADCC of LTalphabeta expressing cells would be sufficient to block LTBETAR-mediated inflammation. The person

skilled in the art could thus not have arrived at the subject-matter of underlying **claims 70-94** without employing inventive skill (Article 33(3) PCT).

- 3.15 The same positive inventive step argumentation applies, mutatis mutandis, to the subject-matter of **claims 97-102** (Article 33(3) PCT).
- 3.16 By extrapolation, the subject-matter of **claims 63-64** which relates to a hybridoma and antibody providing such unexpected therapeutic effectiveness against autoimmune disorders must also involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.17 In contrast, the subject-matter of **claims 95-96** relates to a method of advertising, to mere presentation of information and does not make direct use of the antibody or a product comprising the same and thus does not provide any particular **technical** effect as such. The subject-matter of claims 95-96 thus does not provide any **technical** solution in the sense of Article 33(3) PCT).

V.4 Industrial Applicability

- 4.1 Claims 95-96 relate to a method of advertising and thus to the pure presentation of information about a product, wherein the method does not actually make use of the product in a technological sense. The subject-matter of claims 95-96 is thus not industrially applicable in the sense of Article 33(4) PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- VIII.1 The following terminology is unclear (Article 6 PCT) and leaves the reader in doubt as to the technical features referred to:

"wherein N is any amino acid" (claims 1-2) - normally "N" stands only for the specific amino acid Asparagine. The applicant's of this non-standard meaning of "N" is confusing. Also it is not clear whether i.e. the "N" in claim 2 should also be

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/081154

any amino acid.

"about" (claims 22, 29, 38, 54-58, 90, 91) - subjective term

"affinity ... that is about the same as or greater than the monovalent affinity of [clone S5H3]" (claim 29) - the affinity of mAb S5H3 has not been determined. It is thus unclear to the skilled artisan which functional criteria need to be fulfilled in order to fall within the scope of claim 29

"better affinity ... than a glycoprotein" (claim 43) - in contrast to claim 39 the reference/glycoprotein need not be a wildtype Fc-region. Consequently the skilled reader does not know which glycoprotein serves as reference and thus no clear functional limitation is defined.

"composition comprising the antibodies [1] of claims 1-37, wherein the antibodies [2] in the composition ... lack a fucose"/"comprises at least about 2% afucosylated antibodies" (claims 38, 54-57) - does not specify that the afucosylated antibodies [2] are the same as the anti-LTALPHA-antibodies [1]

"major response" (claim 88) - subjective term

"modulates" (claim 18) - comprises up- and downmodulation to an unspecified degree, thus does not define any clear limit

"compared to ... native-sequence" (claim 26) - not clear what is taken as reference; "native" is not equal to "wildtype"; encompasses wildtype Fc-regions comprising substitutions with respect to reduced ADCC-Fc-variants; in effect meaningless as long as the reference is not clearly defined.

"an antibody that is secreted by ..." (claim 64) - hybridomas are capable of producing more than one type of antibody; not clear that anti-LTalpha antibody S5H3 is meant.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/081154

International filing date (day/month/year)
11.10.2007

Priority date (day/month/year)
12.10.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/24 A61K39/395 A61P37/06
ADD. C07K14/525

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
☐ Box No. II Priority
☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No. IV Lack of unity of invention
☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI Certain documents cited
☐ Box No. VII Certain defects in the international application
☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bumb, Peter

Telephone No. +31 70 340-8936



561

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/081154

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/081154

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☐ claims Nos.

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☒ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/081154

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
 - ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
 - ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-102</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>26-28, 36-58, 63-64, 70-94, 97-102</u>
	No: Claims	<u>1-25, 29-35, 59-62, 65-69, 95-96</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>95-96</u>
2. Citations and explanations
see separate sheet

564

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/081154

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/081154

Reference is made to the following documents:

- D1:** IMAGAWA D K ET AL: "Anti-tumor necrosis factor antibody enhances allograft survival in rats" JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CA, US, vol. 48, no. 4, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 345-348, XP023309844 ISSN: 0022-4804 [retrieved on 1990-04-01]
- D2:** WO 2005/067477 A (CENTOCOR INC [US]; GILES-KOMAR JILL [US]; SCALLON BERNARD J [US]; CAI) 28 July 2005 (2005-07-28)
- D3:** FAVA ROY A ET AL: "A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 JUL 2003, vol. 171, no. 1, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 115-126, XP002508121 ISSN: 0022-1767

Re Item III

Non-establishment of an opinion with respect to novelty, inventive step and industrial applicability

- III.1** Although the underlying application has been found not to fulfill the requirements of Article 13 PCT, the search was carried out over all three of the non-unitary inventions claimed. The following opinion thus relates to the entire set of claims 1-102.

Re Item IV

Lack of unity of invention

- IV.1** The underlying application relates to neutralizing or disease-modifying anti-LTalpha antibodies, and provides several such antibodies (2C8, S5H3, 3F12). Such antibodies are already known in the art (see D1; Table 1) (see D2; example 2). The technical problem to be solved by the underlying application is thus the provision of alternative anti-LTalpha antibodies or alternative uses of anti-LTalpha antibodies. The following technical solutions are proposed in the claims:

Invention 1

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/081154

claims 1-30, 36-62, 65-102 (all in part)

claims 32, 34 (both complete)

Anti-LTalpha antibodies comprising at least one CDR derived from mAb 2C8 or a variant-antibody thereof, namely comprising at least one of SEQ ID Nos: 1-2, 7, 9, 11, 16, 18, 20, 101, 23-26, 102, 103.

Invention 2

claims 1-30, 36-62, 65-102 (all in part)

claims 33, 35 (both complete)

Anti-LTalpha antibodies comprising at least one CDR derived from mAb 3F12 or a variant-antibody thereof, namely comprising at least one of SEQ ID Nos: 3, 4, 5, 8, 13-15, 17, 19, 21, 22, 110, 27-31, 108, 109.

Invention 3

claims 63-64 (both complete)

Anti-LTalpha antibody S5H3, corresponding hybridoma cell line.

IV.2 Unity of inventive concept could have been established by either **(i)** Fc-modification/defucosylation according to claims 26-28, 36-58 or **(ii)** treatment of autoimmune disorders as per claims 70-94. However, **(i)** and **(ii)** would still have formed **two** inventive concepts.

IV.3 Seeing as neutralizing anti-human LTalpha antibodies are already known in the art, considering the thus resulting technical problem to be solved and the technical difference between the technical solutions provided and in view of the fact that no other technical feature could be identified which is both new and common to the proposed solutions, the International Search Authority does not consider the abovementioned three inventions to be linked by a single, general inventive concept (Rule 13 PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/081154

citations and explanations supporting such statement

V.1 Patentability

- 1.1** Claims 69-94 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

V.2 Novelty

- 2.1** An anti-LTalpha antibody comprising structural features according to claim 1 has not been reported. The subject-matter of claims 1-58, 60-62, 69-102 is novel (Article 33(2) PCT).
- 2.2** A hybridoma according to claim 63 has not previously been reported. The subject-matter of claims 63-68 is novel (Article 33(2) PCT).
- 2.3** An anti-idiotypic antibody according to claim 59 has not been reported and is novel (Article 33(2) PCT).

V.3 Inventive Step

- 3.1** D1 is considered the closest prior art to the subject-matter of the underlying application and discloses the amelioration of allograft rejection by means of a neutralizing anti-human LT (= human TNF- β = human LTALPHA) polyclonal antibody in rats (see D1; p. 346, left column; Table 1; abstract last four lines).
- 3.2** The subject-matter of claims 1-7, 32-35 differs from D1 in that the antibody claimed comprises partial structural features (1 CDR, 3 CDRs, 6 CDRs, 1 VH or 1 VL) of mAbs 2C8 or 3F12, or one of their variants.

P2237R1

1/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.022.197 MT/FOP 20070701/0.20.5.10
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2237R1
I	Title of Invention	ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	1-650-225-1000
II-9	Facsimile No.	1-650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	ADAMS, Camellia W.
III-1-5	Address	116C Flynn Avenue Mountain View, California 94043 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

569

P2237R1

2/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	GROGAN, Jane L.
III-2-5	Address	335 Hugo Street San Francisco,, California 94122 United States of America
III-2-6	State of nationality	AU
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	GURNEY, Austin L.
III-3-5	Address	946 Diamond Street San Francisco, California 94114 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	MCCUTCHEON, Krista
III-4-5	Address	1512 Carol Avenue Burlingame, California 94010 United States of America
III-4-6	State of nationality	CA
III-4-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HASAK, Janet E.
IV-1-2	Address	GENENTECH, INC. MS 49 1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	1-650-225-1896
IV-1-4	Facsimile No.	1-650-952-9881

370

P2237R1

4/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	159	-
IX-3	Claims	10	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	32	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	207	
IX-6a	Sequence listing part of description	45	-
IX-7	TOTAL	252	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	Fig 4A and 4B	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Janet E. HASAK - Reg. No. 28,616/	
X-1-1	Name (LAST, First)	HASAK, Janet E.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

571

P2237R1

3/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	12 October 2006 (12.10.2006)
VI-1-2	Number	60/829,257
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	18 May 2007 (18.05.2007)
VI-2-2	Number	60/938,999
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VI-4	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

572

P2237R1

5/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

573

USPTO 2/5/2007 7:03:44 PM PAGE 2/005 Fax Server
JANET E. HASAK COMPANY:1 DNA WAY

JEH/ec

PR 2237



PR 2237

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

FEBRUARY 01, 2007

PTAS

500216301A

500216301A

JANET E. HASAK
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/31/2007

REEL/FRAME: 018833/0419
NUMBER OF PAGES: 6

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2237

ASSIGNOR:
GROGAN, JANE L.

DOC DATE: 01/29/2007

ASSIGNOR:
ADAMS, CAMELLIA W.

DOC DATE: 01/29/2007

ASSIGNOR:
GURNEY, AUSTIN I.

DOC DATE: 01/30/2007

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

57A

USPTO

2/5/2007 7:03:44 PM

PAGE

3/005

Fax Server

IANET E. HASAK COMPANY:1 DNA WAY

018833/0419 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60829257

FILING DATE: 10/12/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

WHEREAS, Camellia W. Adams, a citizen of U.S.A., residing at 1899 Lakebird Drive, San Jose, CA 95124, and Jane L. Grogan, a citizen of Australia, residing at 335 Hugo Street, San Francisco, CA 94122, and Austin I. Gurney, a citizen of U.S.A., residing at 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

for which a provisional application Serial No. 60/829,257 (Docket No. PR2237) has been filed by them on October 12, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

596

Application No. 60/829,257

Docket No. PR2237

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: Jan 29, 2007

Camellia W. Adams
Camellia W. Adams

South San Francisco

Dated: _____

Jane L. Grogan

South San Francisco

Dated: _____

Austin I. Gurney

579

Application No. 60/829,257

Docket No. PR2237

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

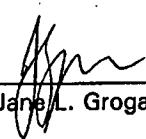
South San Francisco

Dated: _____

Camellia W. Adams

South San Francisco

Dated: Jan 29, 2007



Jane L. Grogan

South San Francisco

Dated: _____

Austin I. Gurney

578

Application No. 60/829,257

Docket No. PR2237

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Camellia W. Adams

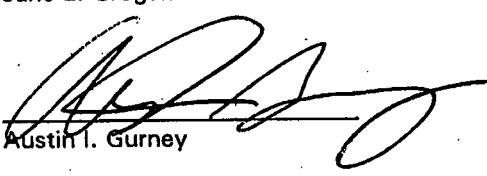
Dated: _____

South San Francisco

Jane L. Grogan

Dated: _____

South San Francisco



Austin I. Gurney

Dated: 1/30/07

579

USPTO

9/6/2007 12:51:18 PM

PAGE

2/005

Fax Server

TO: JANET E. HASAK COMPANY: 1 DNA WAY



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SEPTEMBER 05, 2007

PTAS



500348257

JANET E. HASAK

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 09/05/2007

REEL/FRAME: 019786/0779

NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2237-2

ASSIGNOR:
ADAMS, CAMELLIA W.

DOC DATE: 08/16/2007

ASSIGNOR:
GROGAN, JANE L.

DOC DATE: 07/30/2007

ASSIGNOR:
GURNEY, AUSTIN I.

DOC DATE: 07/20/2007

ASSIGNOR:
MCCUTCHEON, KRISTA

DOC DATE: 07/20/2007

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY

580

USPTO

9/6/2007 12:51:18 PM

PAGE

3/005

Fax Server

TO: JANET E. HASAK COMPANY: 1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080

019786/0779 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60938999

FILING DATE: 05/18/2007

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

581

Docket No. PR2237-2

ASSIGNMENT

WHEREAS, Camellia W. Adams, a citizen of U.S.A., residing at 116C Flynn Avenue, Mountain View, CA 94043, and Jane L. Grogan, a citizen of Australia, residing at 335 Hugo Street, San Francisco, CA 94122, and Austin I. Gurney, a citizen of U.S.A., residing at 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114, and Krista McCutcheon, a citizen of Canada, residing at 1512 Carol Avenue, Burlingame, CA 94010 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODIES TO LYMPHOTOXIN-ALPHA

for which a provisional application Serial No. 60/938,999 (Docket No. PR2237-2) has been filed by them on May 18, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

582

Application No. 60/938,999

Docket No. PR2237-2

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: Aug 16, 2007

Camellia W. Adams
Camellia W. Adams

South San Francisco

Dated: _____

Jane L. Grogan

South San Francisco

Dated: _____

Austin I. Gurney

South San Francisco

Dated: _____

Krista McCutcheon

583

Application No. 60/938,999

Docket No. PR2237-2

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

Camellia W. Adams

South San Francisco

Dated: July 30, 2007

Jane L. Grogan

South San Francisco

Dated: _____

Austin I. Gurney

South San Francisco

Dated: _____

Krista McCutcheon

584

Application No. 60/938,999

Docket No. PR2237-2

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Camellia W. Adams

Dated: _____

South San Francisco

Jane L. Grogan

Dated: _____

South San Francisco

Austin I. Gurney

Dated: _____

South San Francisco

Krista M. McCutcheon
Krista McCutcheon

Dated: July 20, 2007

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

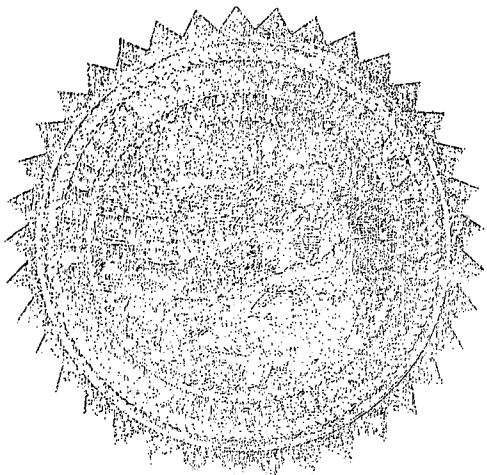
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

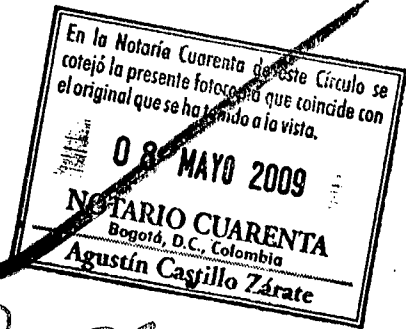
CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

Secretary of State

[Handwritten signature]

986

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

SS.

On

December 6, 2005

Date

before me,

Aida Mielat Guiam

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

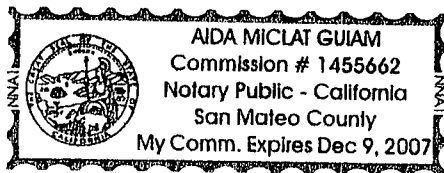
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s); or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guiam
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Document Date:

Number of Pages:

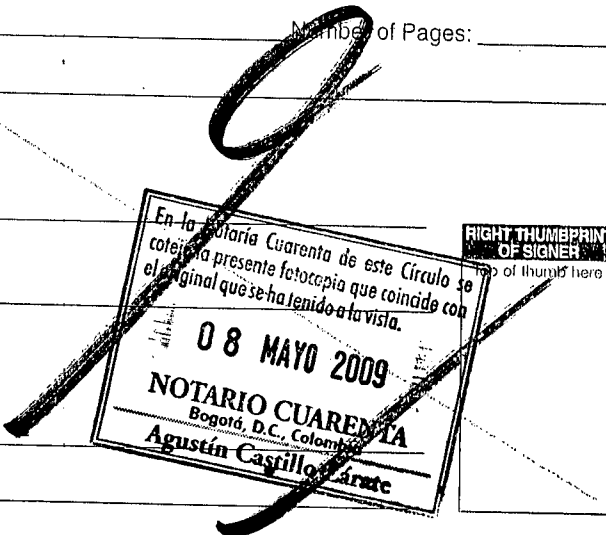
Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s):
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other:

Signer Is Representing:



PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciliado(s) en

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990
USA

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como mandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre

Cargo

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

South San Francisco, California
USA

Granted and signed in

6th

day

of December 2005

Signature

Name

Title

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

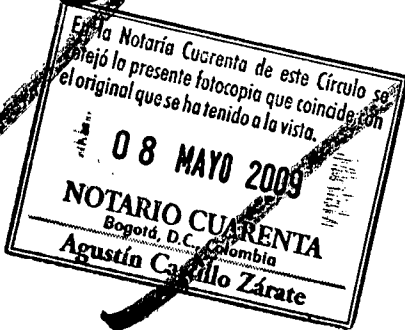
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



989

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por Genentech, Inc. domiciliada en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

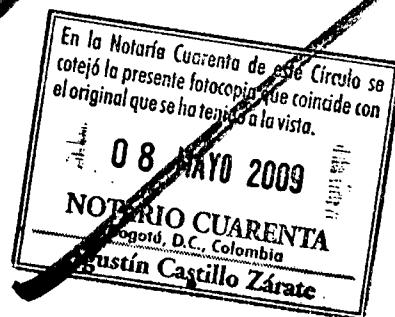
1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-OPCIONAL

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____
 Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____
 Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- Nombre del inquilante: _____
- ☐ Individo
- ☐ Funcionario Corporativo – Titulo(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Abogado de hecho
- ☐ Fideicomisario
- ☐ Guardián o conservador
- ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



En la Notaría Cuarentena de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

8 MAY 2009

NOTARIO CUARENTA

Bogotá, D.C., Colombia

Agustín Castillo Zárate

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
8 MAYO 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

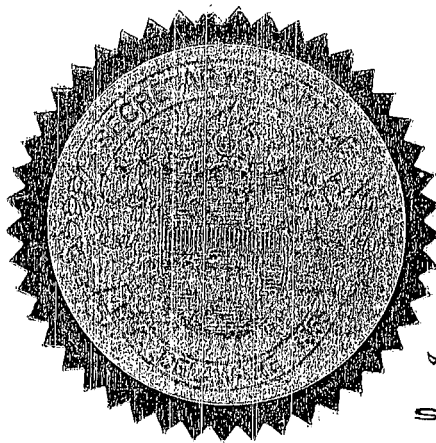
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

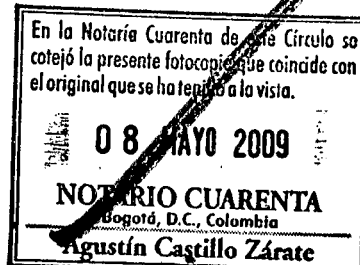
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



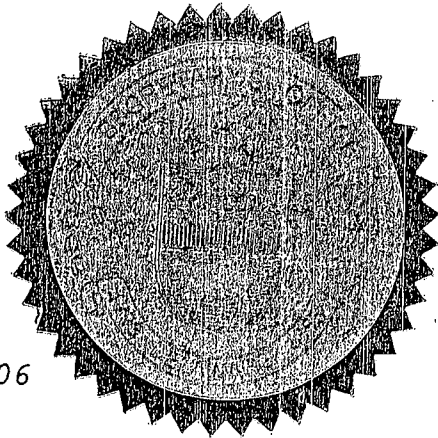
Delaware

PAGE 1

593

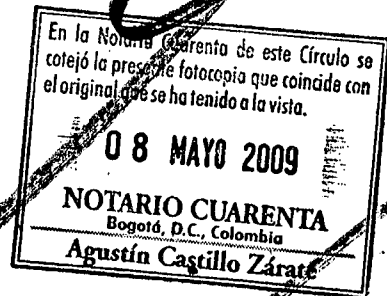
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

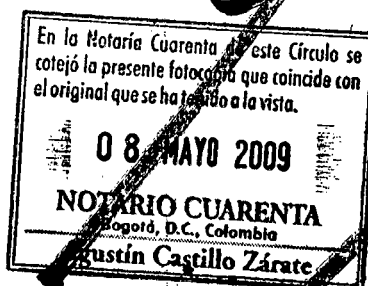
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

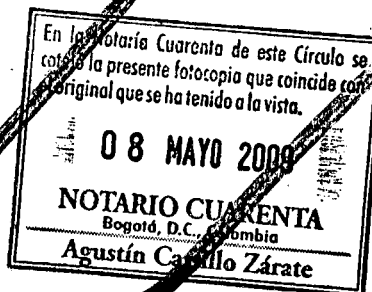
SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

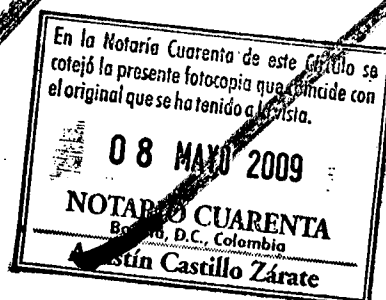
(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

2



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

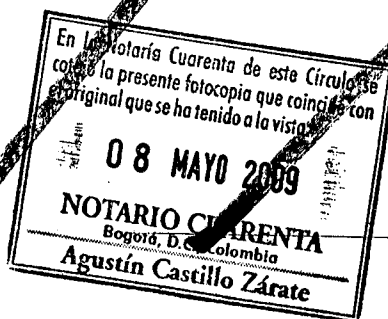
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



598

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

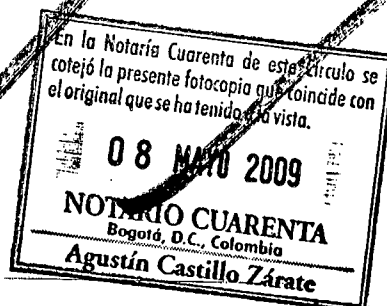
SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



599

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

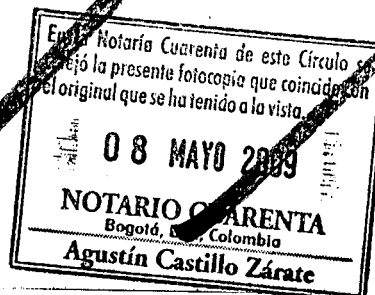
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



600

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

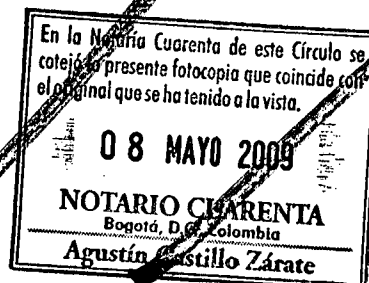
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



601

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "**Corporation**" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "**Roche**" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "**affiliates**" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

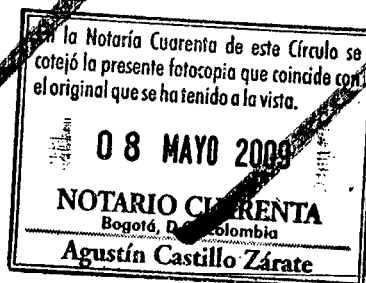
SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

8



602

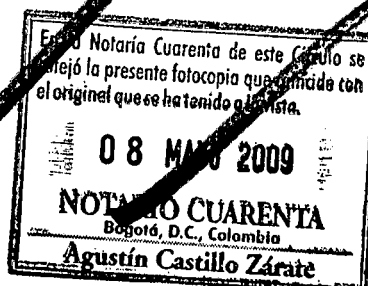
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

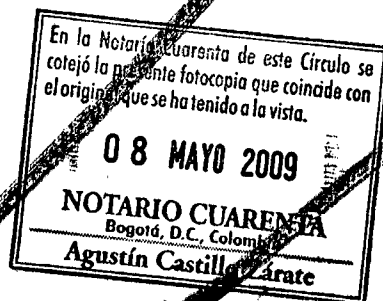


803

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

10



604

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



605

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

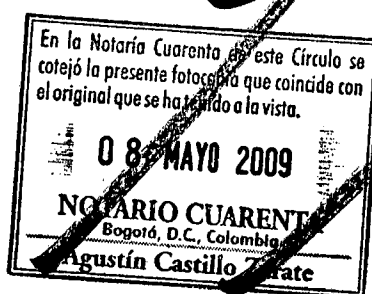
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

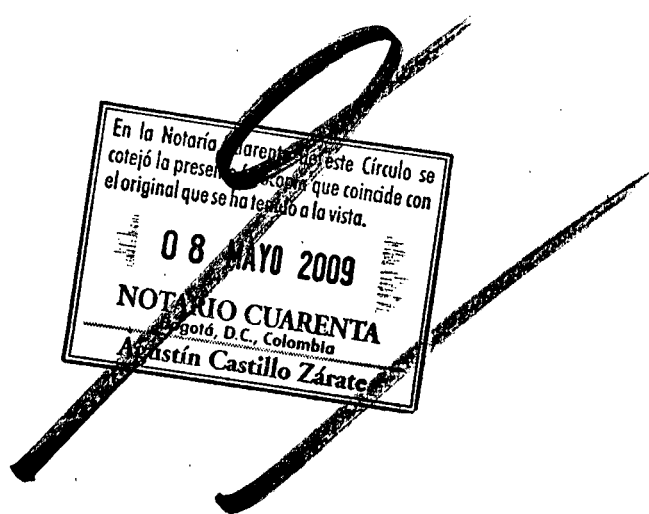
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



606

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384
FECHA: 05 - 24 - 05

607

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

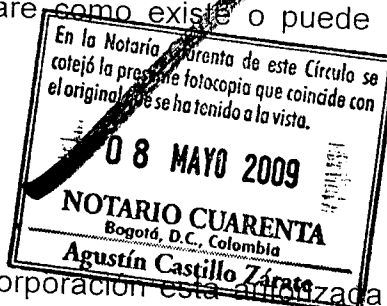
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación esta autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



608

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

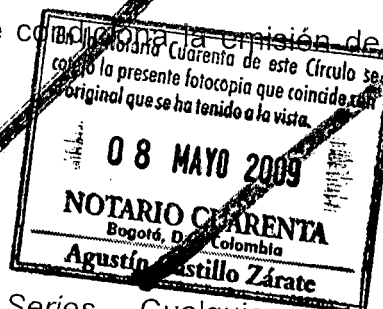
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condicione la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



609

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

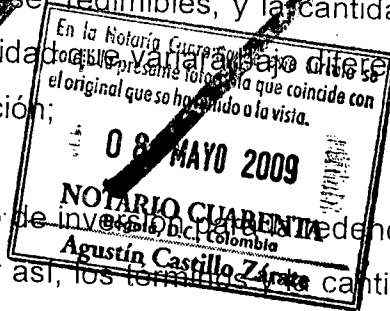
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que puede variar en diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

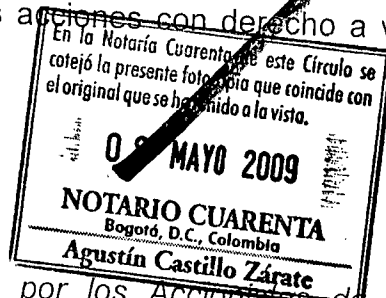
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier



acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

En la Notaría Cuarenta y tres se recibió el original que se ha tenido a la vista.
08 MAYO 2009
NOTARIO CUARENTA y tres
Cristín Castilla Zárate

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

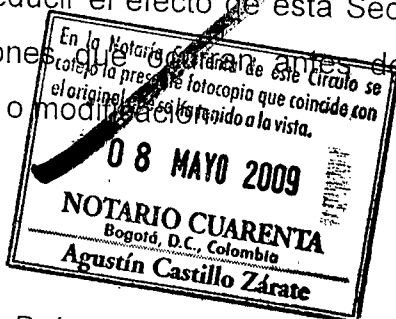
(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7



SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.

ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito.

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o directores de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
08 MAYO 2009
NOTARÍA CUARENTA
Agustín Castillo Zárate

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiriera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se



define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

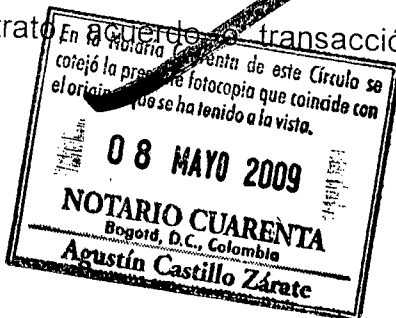
En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
08 MAYO 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



617

SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

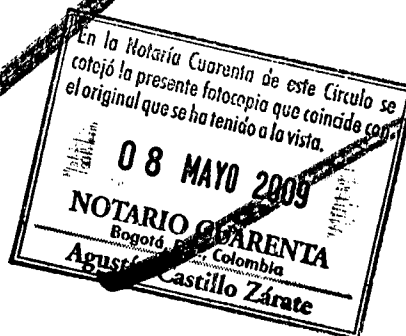
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

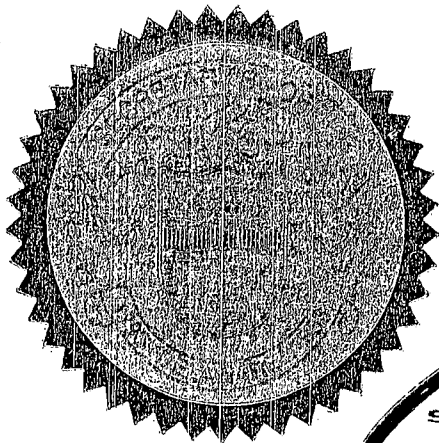
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

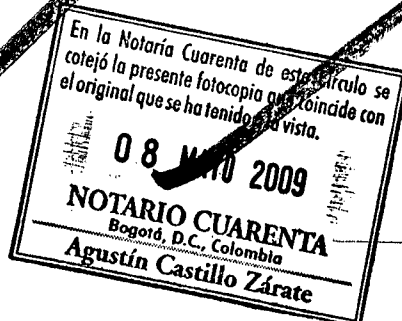
8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



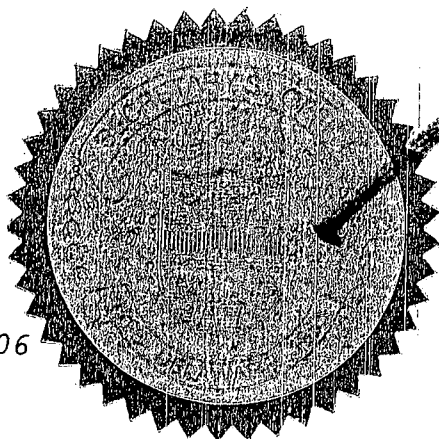
Delaware

PAGE 1

619

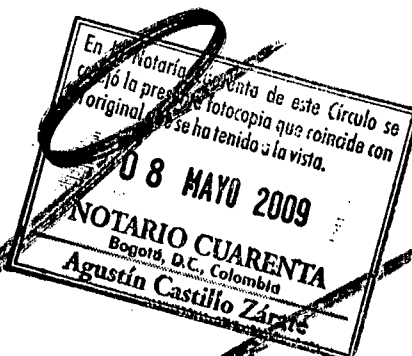
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

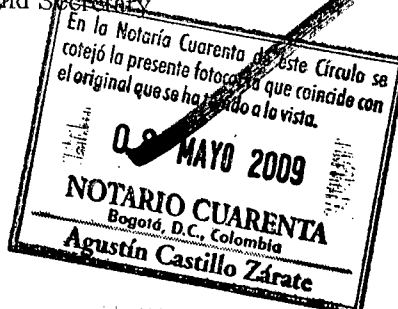
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



62'

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

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 Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

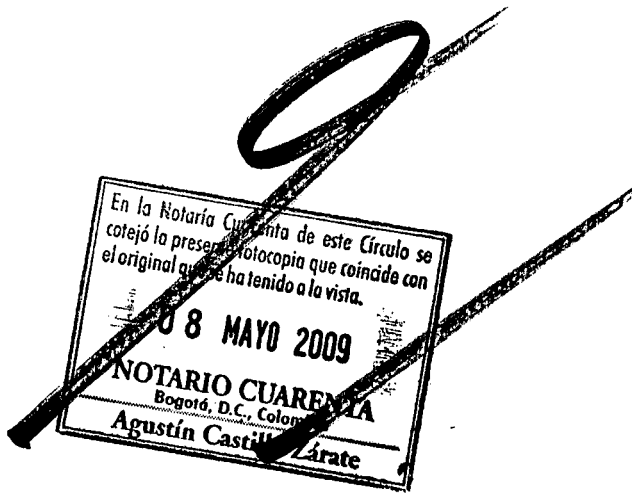
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

623

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

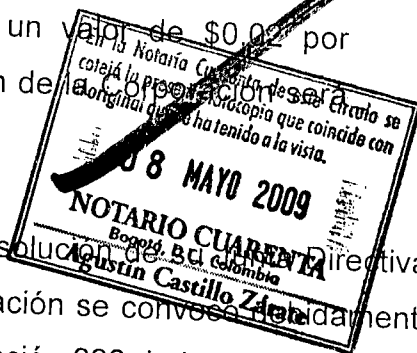
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de la Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



624

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

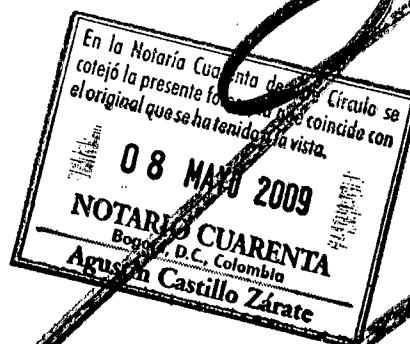
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

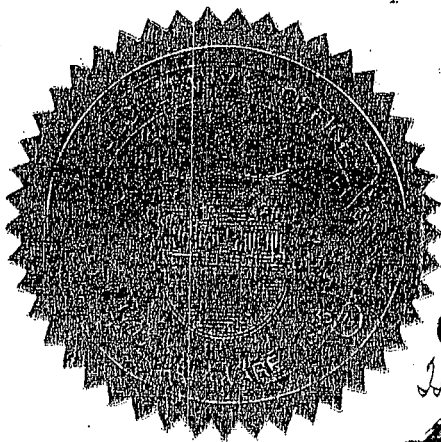
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D.: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

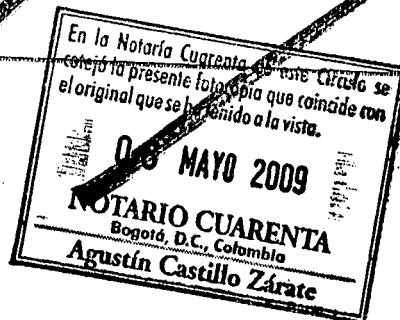
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



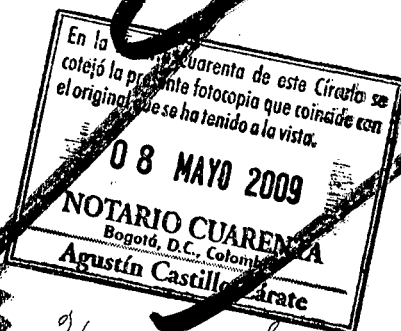
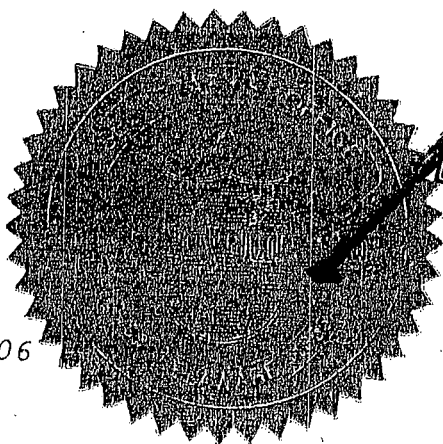
Delaware

PAGE 1

626

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

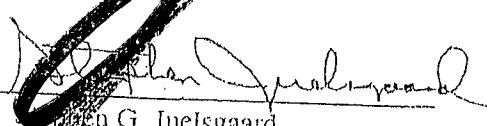
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

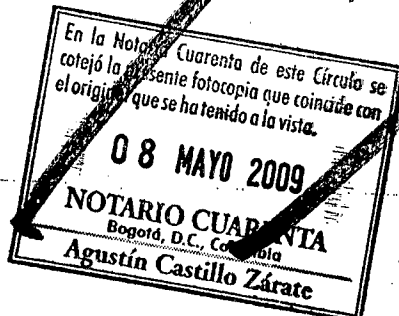
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



APOSTILLA

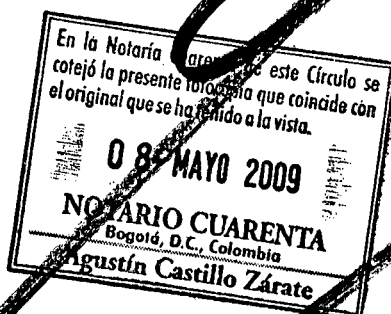
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

630

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

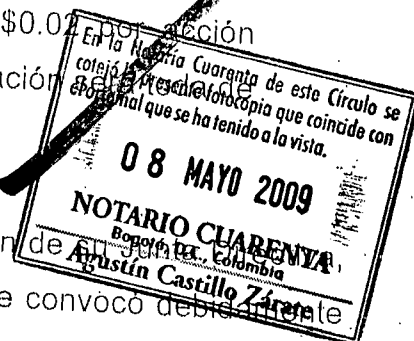
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de la Junta de la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente



6

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

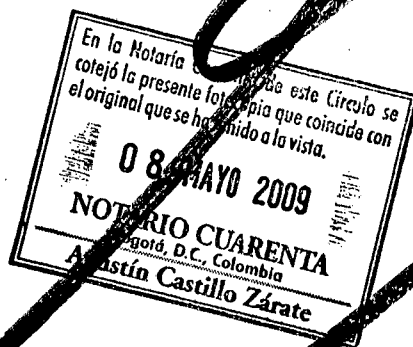
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

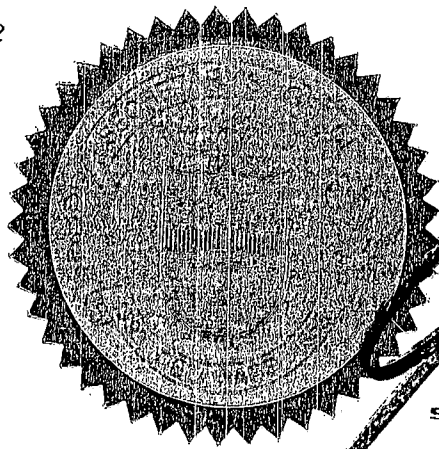
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

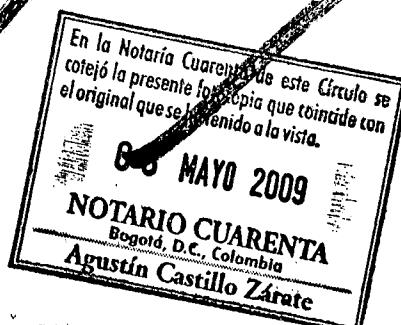
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



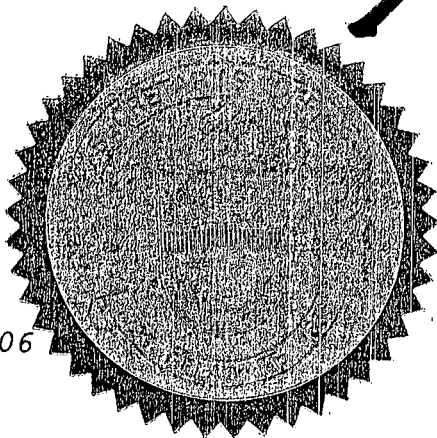
Delaware

PAGE 1

633

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

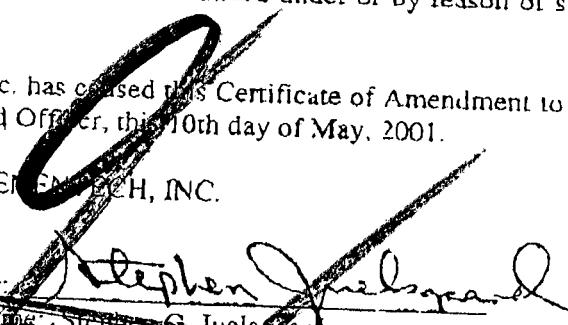
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

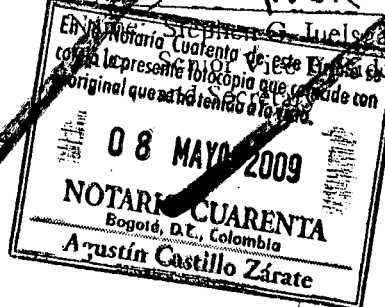
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: 
Stephen G. Juelsgaard
General Counsel



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 Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



636

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

67.

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

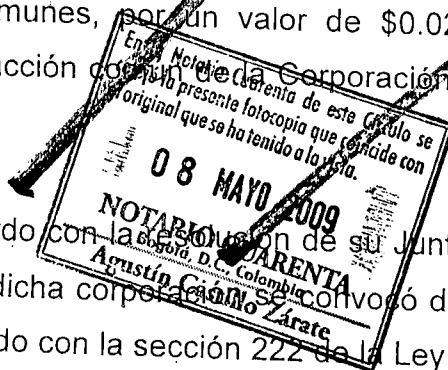
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





No. 09-048130- -00000-0000

Fecha: 2009-05-12 17:07:59

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTE I/II

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 638

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAREQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

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 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 se 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 trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Nueva Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 6, 7 y 10

Computador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@slc.gov.cowww.slc.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 48130
	Solicitud internacional	PCT/US2007/081154
	Fecha inicio fase nacional	12/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6223

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:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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 No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 05 JUN. 2009
jfernand