

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.04.20	(73) Titular(es): ZYMOGENETICS, INC.	
(30) Prioridade(s): 2008.05.01 US 49706	1201 EASTLAKE AVENUE EAST SEATTLE, WA	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.03.09	98102-3702	US
(45) Data e BPI da concessão: 2016.04.13 131/2016	(72) Inventor(es): STACEY R. DILLON BRANDON J. HARDER	US US
	(74) Mandatário: VASCO STILLWELL DE ANDRADE RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **NÍVEIS SÉRICOS DE HETEROTRÍMEROS BLYS/APRIL E UTILIZAÇÃO EM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM MÉTODO DE MEDIÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HETEROTRÍMEROS (HT) BLYS/ APRIL NUMA AMOSTRA BIOLÓGICA, NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA. OS ENSAIOS DE DIAGNÓSTICO SÃO ÚTEIS EM PREDIZER A PROBABILIDADE DUM INDIVÍDUO DESENVOLVER OU SOFRER ATUALMENTE DUMA DOENÇA AUTOIMUNE, TAL COMO LES E PARA MÉTODOS DE TRATAMENTO DUM INDIVÍDUO CLINICAMENTE DIAGNÓSTICADO COM UMA DOENÇA AUTOIMUNE. ESTE TESTE DE DIAGNÓSTICO SERVE PARA PREDIZER A PROBABILIDADE DUM PACIENTE RESPONDER A UM TRATAMENTO COM UM FÁRMACO ESPECÍFICO, EM PARTICULAR UM TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS HT, QUER ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS FÁRMACOS IMUNOSSUPRESSORES.

RESUMO

NÍVEIS SÉRICOS DE HETEROTRÍMEROS BLYS/APRIL E UTILIZAÇÃO EM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A presente invenção proporciona um método de medição dos níveis séricos de heterotrímeros (HT) BLyS/ APRIL numa amostra biológica, numa forma de realização preferida. Os ensaios de diagnóstico são úteis em prever a probabilidade dum indivíduo desenvolver ou sofrer atualmente duma doença autoimune, tal como LES e para métodos de tratamento dum indivíduo clinicamente diagnosticado com uma doença autoimune. Este teste de diagnóstico serve para prever a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com um fármaco específico, em particular um tratamento com antagonistas HT, quer isoladamente ou em combinação com outros fármacos imunossupressores.

DESCRIÇÃO

NÍVEIS SÉRICOS DE HETEROTRÍMEROS BLYS/APRIL E UTILIZAÇÃO EM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

As interações celulares que ocorrem durante uma resposta imune são reguladas por membros de várias famílias de recetores de superfície de célula, incluindo a família do recetor do fator de necrose tumoral (TNFR). A família TNFR consiste num número de recetores de glicoproteína de membrana integral, muitos dos quais, em conjunção com os seus respetivos ligandos, regulam interações entre diferentes linhagens de células hematopoiéticas (Smith *et al.*, The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation and Death, 76:959-62, 1994; Cosman, Stem Cells 12:440-55, 1994). Três membros recetores desta família são (1) BCMA, Antígeno de Maturação da Célula B (Gras *et al.*, Int. Immunol. 17:1093-106, 1995 e Hatzoglou *et al.*, J. Immunol., 165: 1322-30, 2000); (2) TACI, ativador transmembranar e interator de CAML (von Bülow e Bram, Science 228:138-41, 1997 e Publicação WIPO documento WO 98/39361)) e (3) BAFF-R, também conhecido como recetor 3 de BLyS/BLyS (BR3) (Thompson *et al.*, Science, 293: 2108-11, 2001). Estes recetores são conhecidos por ligarem um ou ambos os ligandos de TNF - estimulador de linfócitos B (BLyS também conhecido por BLyS, TALL-1, ztnf4 e THANK) (ver, por exemplo, Shu *et al.*, J. Leukoc. Biol. 65: 680-683 (1999)) e um ligando indutor de proliferação (APRIL) (ver, por exemplo, Hahne *et al.*, J. Exp. Med. 188: 1185-1190 (1998)). Especificamente, TACI e BCMA são conhecidos por ligarem ambos BLyS e APRIL e BAFF-R apenas liga BLyS.

Um número de antagonistas BLyS e/ou APRIL foram desenvolvidos a fim de bloquear a ligação dos ligandos aos

membros recetor da família, a fim de bloquear os resultados desta ligação que inclui, mas não deve ser limitada a, co-estimulação de células B, sobrevivência de plasmablast e células de plasma, a troca de classe de Ig, função de células apresentadoras de antígeno de células B aumentado, sobrevivência de células B malignas, desenvolvimento da função de células B-1, desenvolvimento de células B para além da fase T-1 e a formação de centro germinal completo. Algumas destas moléculas também podem ligar-se e bloquear o efeito de APRIL nas células B e noutros componentes do sistema imunitário (Dillon et al. (2006) Nat. Rev. Drug Dis. 5, 235-246). As moléculas que foram desenvolvidas para afetar a função da célula B interferindo com a ligação BLyS e/ou APRIL incluem anticorpos BLyS tal como Lymphostat-B (Belimumab) (Baker et al., (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253-3265 e o documento WO 02/02641); domínio extracelular do recetor/proteínas de fusão domínio de Fc tal como TACI-Ig, que inclui uma forma de realização particular, atacicept (Pedido de Patente U.S. N.º 20060034852), BAFF-R-Fc (documento WO 05/0000351) e BCMA-Ig ou outras proteínas de fusão que utilizam domínios extracelulares recetores. Uma classe adicional de antagonistas BLyS e/ou APRIL inclui outras moléculas que dependem da capacidade de ligação BLyS para bloquear a ligação aos seus recetores tais como AMG 623, recetor de anticorpos e outras moléculas divulgados no documento WO 03/035846 e o documento WO 02/16312.

Um aspeto pouco estudado desta família ligando/recetor é o facto destes ligandos parecem existir *in vivo* não apenas como homotrímeros (o que seria esperado para ligandos da família de TNF), mas também como heterotrímeros (HT) BLyS/APRIL de estequiometria não caracterizada. Utilizando uma amostra definida extremamente pequena e heterogénea (isto é, 15 pacientes com diagnóstico, entre eles, de 6 doenças autoimune diferentes), a existência de HT elevado nos soros em comparação com controlos saudáveis

foi relatado por Roschke et al. (J. Immunol. 169: 4314-4321, 2002). No entanto, não houve associação entre a presença de HT elevado com qualquer doença autoimune particular, uma análise necessária para aplicar tais descobertas a métodos de tratamento duma doença específica nem esta descoberta tem sido apresentada além de informalmente, isto é, com significância estatística.

Assim, permanece uma necessidade na técnica da investigação na atividade biológica de HT e o desenvolvimento de um ensaio para comparar os níveis de HT nativo aos de BLYS e APRIL homotriméricos em pacientes autoimunes. Além disso, este ensaio permite a identificação de padrões de expressão de HT de modo a que as associações estatísticas com doença autoimune possam ser identificadas, tal como lúpus eritematoso sistémico (LES). Tal informação é importante para identificar indivíduos que têm uma propensão para o desenvolvimento de tais doenças autoimunes, estão num estado de doença ativa e para identificar aqueles que responderão favoravelmente ao tratamento de antagonista BLYS e/ou APRIL destas doenças. A presente especificação descreve os níveis de HT associados com doenças autoimunes e proporciona testes de diagnóstico que determinam a presença deste padrão de expressão, nomeadamente níveis séricos de HT aumentados para aqueles que sofrem de doença autoimune tal como LES em comparação com níveis vistos em controlos saudáveis.

Roschke V et al., J. Immunology, Volume 169, 1 de janeiro de 2002, paginas 4314-4321, relata aquela forma biologicamente ativa dos heterotrímeros BLYS e APRIL que são expressos em pacientes com doenças reumáticas baseadas no sistema imunológico imunologia sistémica.

Malin V Jonsson et al., J. Clin. Immunology, Volume 25(3), 1 de maio de 2005, paginas 189-201, relata que existe uma associação entre os níveis circulantes de APRIL e BAFF e a organização linfóide no Síndrome de

Sjögren primário.

Daridon et al., Autoimmunity Reviews, Volume 7(4), 1 de fevereiro de 2008, paginas 267-271, descreve BAFF, APRIL e TWE-PRIL.

Seyler Thorsten M et al., J. Clin. Investigation, Volume 115(11), novembro 2005, paginas 3083-3092, descreve BLYS e APRIL em artrite reumatoide.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao rastreio para níveis séricos de HT e noutras amostras biológicas. Como tem sido mostrado, níveis elevados de HT são associados significativamente com doença autoimune, tal como AR, esta medição é útil como um ensaio de diagnóstico. Tais ensaios de diagnóstico são úteis a predizer uma probabilidade dum indivíduo ter uma condição associada com atividade autoimune, tal como LES. A divulgação refere-se ainda a determinar um tratamento apropriado para um indivíduo com LES.

A deteção de altos níveis séricos de HT de pacientes que exibem atividade autoimune, tal como LES, permite a seleção dum plano de tratamento que é mais provável ser eficaz em tratar a condição. Estes planos de tratamento envolvem geralmente a utilização de antagonistas BLYS e/ou APRIL, quer isoladamente ou em combinação com outro produto farmacêutico tal como um fármaco imunossupressor (como MMF ou Cellcept®) ou um antagonista CD 20 (como Rituxan®).

Assim, a divulgação refere-se ainda a tratar um indivíduo recentemente diagnosticado clinicamente com LES, que compreende geralmente a deteção de altos níveis séricos de HT, em comparação com níveis séricos vistos em controlos saudáveis. A deteção de altos níveis séricos de HT permite predizer a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármaco específico que compreende antagonistas BLYS e/ou APRIL. Assim, a invenção proporciona métodos de predizer a probabilidade dum paciente responder

a antagonistas BLYS e/ou APRIL (quer isoladamente ou em combinação com outros fármacos) durante o tratamento para LES, como definido nas reivindicações.

Muito especificamente, a presente especificação descreve um método de detecção de níveis séricos de HT aumentados dum indivíduo que compreende a medição dum primeiro nível dos níveis da proteína HT numa amostra biológica e comparar esse nível com um segundo nível dos níveis da proteína HT presente numa amostra biológica dum indivíduo saudável e determinar se o primeiro nível aumentou em comparação com o segundo nível, em que o referido aumento dos níveis da proteína HT está associado com uma doença autoimune. A doença autoimune pode ser selecionada dum grupo que consiste em artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, lúpus eritematoso sistémico (LES), nefrite lúpica (NL), Doença de Wegener, doença inflamatória dos intestinos, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia gravis, vasculite, diabetes mellitus, Síndrome de Raynaud, Síndrome de Sjogren e glomerulonefrite. Nos métodos da invenção a doença autoimune é LES.

A presente especificação descreve um método de tratar um indivíduo diagnosticado clinicamente com uma doença autoimune, que compreende analisar uma amostra biológica dum indivíduo diagnosticado clinicamente com doença autoimune para a presença ou ausência de elevados níveis séricos de HT, em que a presença de elevados níveis de HT está associada com o diagnóstico clínico de doença autoimune e seleccionar um plano de tratamento que é mais eficaz para indivíduos diagnosticados clinicamente como tendo uma condição associada com níveis de HT aumentados. O plano de tratamento pode envolver a administração dum antagonista BLYS. E, numa forma de realização preferida, o

referido antagonista BLYS também pode ser um antagonista APRIL. Em particular, o plano de tratamento deverá envolver a administração dum antagonista HT. Para este método a doença autoimune pode ser selecionada do grupo que consiste em artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, lúpus eritematoso sistémico (LES), nefrite lúpica (NL), doença de Wegener, doença inflamatória dos intestinos, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia gravis, vasculite, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren e glomerulonefrite. Em particular, a doença autoimune é LES.

A presente invenção descreve métodos *in vitro* (como definido nas reivindicações) para predizer a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármaco para LES, que compreende determinar o nível sérico de HT, em que a presença de níveis de HT elevados é preditiva da probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármaco para LES. Além disso, na presente invenção o tratamento com fármaco pode envolver a administração dum antagonista HT, o qual também pode ser um antagonista BLYS e/ou APRIL.

A presente invenção refere-se a um método *in vitro* de deteção de níveis séricos de HT aumentados dum indivíduo, que compreende medição o nível dos níveis de HT numa amostra biológica de teste do indivíduo; comparar esse nível com o nível dos níveis de HT numa amostra biológica dum controlo saudável e determinar se o nível dos níveis de HT na amostra biológica de teste está aumentado em comparação com o nível na amostra de controlo; em que o referido aumento de níveis de HT está associado com LES.

A presente especificação descreve um método *in vitro* de seleccionar um plano de tratamento que é mais eficaz para tratar um indivíduo diagnosticado clinicamente com uma

doença autoimune, que compreende analisar *in vitro* uma amostra biológica dum indivíduo diagnosticado clinicamente com doença autoimune para a presença ou ausência de níveis séricos de HT elevados, em que a presença de níveis de HT elevados está associada com o diagnóstico clínico de doença autoimune. Para este método o plano de tratamento pode envolver a utilização dum antagonista HT e o antagonista HT também pode ser um antagonista BLyS e/ou APRIL. A doença autoimune pode ser selecionada do grupo que consiste em artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, lúpus eritematoso sistémico (LES), nefrite lúpica (NL), Doença de Wegener, doença inflamatória dos intestinos, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia gravis, vasculite, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren e glomerulonefrite. Em particular, a doença autoimune é LES.

Ainda numa forma de realização adicional, a presente invenção inclui um método *in vitro* (como definido nas reivindicações) para predizer a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármaco para LES, que compreende determinar o nível dos níveis de HT numa amostra do paciente; em que a presença de níveis de HT elevados é preditiva da probabilidade do paciente responder a um tratamento com fármaco para LES.

O tratamento com fármaco pode compreender um antagonista HT e o referido antagonista HT também pode ser um antagonista BLyS e/ou APRIL.

Finalmente, a presente especificação descreve um antagonista BLyS para utilização no tratamento duma doença autoimune num paciente, em que o referido paciente tem níveis dos níveis séricos de HT elevados. O antagonista também pode ser um domínio extracelular do recetor/proteínas de fusão domínio de Fc selecionado de

TACI-Ig e BCMA-Ig. Em particular, o domínio extracelular do recetor/proteínas de fusão domínio de Fc pode ser TACI-Ig, tal como atacicept.

Estes e outros aspetos da invenção tornar-se-ão evidentes para os peritos na especialidade após a leitura dos detalhes da invenção, como mais completamente descritos abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1. é um gráfico de dispersão dos níveis de heterotrímico para uma coorte de pacientes diagnosticados com LES ou AR, bem como controlos saudáveis.

A FIGURA 2 expressa os dados da FIGURA 1 que mostra os níveis médios de heterotrímico.

A FIGURA 3 representa graficamente os níveis de heterotrímico numa segunda coorte de pacientes com LES.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método *in vitro* (como definido nas reivindicações) para rastrear níveis de HT em amostras de soro e a utilização desta informação para prever a presença de LES e prever a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com antagonista HT. A invenção é baseada na descoberta de que os níveis dos níveis séricos de HT de pacientes autoimunes são estatisticamente elevados. Os antagonistas HT (que também podem ser antagonistas BLYS e/ou APRIL) neutralizam seletivamente a produção de imunoglobulina autoimune e outros e outras citocinas destrutivas de tecido pelas células imunes, tais como as células B, dos referidos pacientes. Esta observação permite o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico para detetar a presença de níveis de HT aumentados em que estes níveis mais altos estão associados com doença autoimune, tal como LES e também pode prever a probabilidade de que um indivíduo irá responder com sucesso a métodos de tratamento que neutralizam a ação de células imunológicas reativas, tal como células B, isto

é, antagonistas HT (antagonistas BLYS e/ou APRIL).

Antes da presente invenção ser descrita, deve ser entendido que esta invenção não está limitada às formas de realização particulares descritas, como tal podem, naturalmente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia utilizada no presente documento é para o propósito de descrever apenas formas de realização particulares e não pretende ser limitativa, visto que o âmbito da presente invenção apenas será limitado pelas reivindicações apenasas.

A menos que seja definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente documento têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um perito na especialidade à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos no presente documento possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são agora descritos.

Deve ser notado que como utilizado no presente documento e nas reivindicações apenasas, as formas singular "um/uma", "e" e "o/a" incluem os referentes plural a não ser que o contexto dite claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um polimorfismo" inclui uma pluralidade de tais polimorfismos, a referência a "uma molécula de ácido nucleico" inclui uma pluralidade de tais moléculas de ácido nucleico e a referência a "o método" inclui a referência a um ou mais métodos, etapas do método e equivalentes do mesmo conhecidos dos peritos na especialidade, e assim por diante.

As publicações discutidas no presente documento são proporcionadas unicamente para a sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada no presente documento é para ser interpretado como uma admissão que a presente invenção não tem o direito a antedatar tal

publicação em virtude de invenção anterior. Além disso, as datas de publicação proporcionadas podem ser diferentes das datas de publicação reais as quais podem necessitar de confirmação independente.

Definições

O termo heterotrímero (HT), como utilizado no presente documento abrange multímeros de três subunidades do ligando, em que cada subunidade do ligando é ou BLYS ou APRIL e pelo menos uma subunidade é BLYS e pelo menos uma subunidade é APRIL. Assim, "HT" inclui aquelas moléculas que são 2 BLYS e um APRIL, bem como aquelas que são 2 APRIL e um BLYS.

O termo "polimorfismo", como utilizado no presente documento, refere-se a uma diferença no nucleótido ou sequência de aminoácidos de uma dada região em comparação com um nucleótido ou sequência de aminoácidos numa região homóloga de outro indivíduo, em particular, uma diferença no nucleótido ou sequência de aminoácidos de uma dada região que difere entre indivíduos da mesma espécie. Um polimorfismo é geralmente definido em relação a uma sequência de referência. Os polimorfismos incluem diferenças de nucleótido único, diferenças na sequência de mais de um nucleótido e inserções de nucleótido únicos ou múltiplos, inversões e deleções; bem como diferenças de um aminoácido único, diferenças na sequência de mais de um aminoácido e as inserções de aminoácido único ou múltiplo, inversões e deleções.

Os termos "polinucleótido" e "molécula de ácido nucleico" são utilizados de forma intersubstituível no presente documento para referir formas poliméricas de nucleótidos de qualquer comprimento. Os polinucleótidos podem conter desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos e/ou os seus análogos. Os nucleótidos podem ter qualquer estrutura tridimensional e podem desempenhar qualquer função conhecida ou desconhecida. O termo "polinucleótido"

inclui moléculas de cadeia simples, de cadeia dupla e helicoidal tripla. "Oligonucleótido" refere-se geralmente a polinucleótidos de entre cerca de 5 e cerca de 100 nucleótidos de ADN de cadeia simples ou dupla. No entanto, para os propósitos desta divulgação não há limite superior para o comprimento dum oligonucleótido. Os oligonucleótidos também são conhecidos como oligómeros ou oligos e podem ser isolados de genes ou sintetizados quimicamente por métodos conhecidos na técnica.

As seguintes são formas de realização não limitativas de polinucleótidos: um gene ou fragmento de gene, exões, intrões, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plasmídeos, vetores, ADN isolado de qualquer sequência, ARN isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico e iniciadores. Uma molécula de ácido nucleico também pode compreender moléculas de ácido nucleico modificadas, tais como moléculas de ácido nucleico metilado e análogos de molécula de ácido nucleico. Os análogos de purinas e pirimidinas são conhecidos na técnica. Os ácidos nucleicos podem ocorrer naturalmente, por exemplo ADN ou ARN, ou podem ser análogos sintéticos, como conhecido na técnica. Tais análogos podem ser preferenciais para a utilização como sondas devido à estabilidade superior sob condições de ensaio. Modificações na estrutura nativa, incluindo alterações no esqueleto, açúcares ou bases heterocíclicas, têm mostrado aumentar a estabilidade intracelular e a afinidade de ligação. Entre as mudanças úteis na química do esqueleto são fosforotioatos, fosforoditioatos, onde ambos os oxigénios que não fazem ponte são substituídos por enxofre: fosforoamidites; fosfotriésteres alquilo e boranofosfatos. Os derivados de fosfato aquiral incluem 3'-O'-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato e 3'-NH-5'-O-fosforamidato. Os ácidos nucleicos peptídicos substituem todo o esqueleto fosfodiéster ribose

com uma ligação peptídica.

As modificações do açúcar também são utilizadas para potencializar estabilidade e afinidade. O anômero α de desoxirribose pode ser utilizado onde a base é invertida com respeito ao anômero β natural. O 2'-OH do açúcar ribose pode ser alterado para formar açúcares 2'-O-metilo ou 2'-O-alilo, os quais proporcionam resistência à degradação sem comprometer a afinidade.

A modificação das bases heterocíclicas deve manter o emparelhamento de bases adequado. Algumas substituições úteis incluem desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicitidina e 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. 5-propinil-2'-desoxiuridina e 5-propinil-2'-desoxicitidina, foram mostradas para aumentar a afinidade e a atividade biológica quando substituídas por desoxitimidina e desoxicitidina, respectivamente.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína", utilizados de forma intersubstitível no presente documento, referem-se a uma forma polimérica de aminoácidos de qualquer comprimento, que podem incluir aminoácidos codificados e não codificados, aminoácidos modificados quimicamente ou bioquimicamente ou derivatizados e polipeptídeos possuindo esqueletos peptídeos modificados. O termo inclui proteínas de fusão, que incluem, mas não limitadas a, proteínas de fusão com uma sequência de aminoácidos heteróloga, fusões com sequências líder heterólogas e homólogas, com ou sem resíduos de metionina N-terminal; proteínas marcadas imunologicamente e semelhante.

No sentido mais amplo, como utilizado no presente documento, os termos "doença autoimune," refere-se a uma doença em que o sistema imunitário dum paciente está a produzir uma resposta imunitária indesejada a uma ou mais das suas próprias proteínas. Exemplos representativos de doenças autoimunes incluem artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, lúpus eritematoso sistémico (LES),

nefrite lúpica (NL), Doença de Wegener, doença inflamatória dos intestinos, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia gravis, vasculite, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren e glomerulonefrite.

Um polinucleótido "substancialmente isolado" ou "isolado" é um que é substancialmente livre das sequências com as quais está associado na natureza. Por substancialmente livre significa pelo menos 50%, preferentemente pelo menos 70%, mais preferentemente pelo menos 80%, e ainda mais preferentemente pelo menos 90% livre dos materiais com os quais está associado na natureza. Como utilizado no presente documento, um polinucleótido "isolado" refere-se também a polinucleótidos recombinantes, os quais, em virtude de origem ou manipulação: (1) não estão associados com o todo ou uma porção dum polinucleótido com o qual está associado na natureza, (2) estão ligados a um polinucleótido diferente daquele a que está ligado na natureza ou (3) não ocorrem na natureza.

As reações de hibridização podem ser realizadas sob condições de diferente "rigor". As condições que aumentam o rigor numa reação de hibridização são amplamente conhecidas e publicadas na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989). Os exemplos de condições relevantes incluem (por ordem de rigor crescente): temperaturas de incubação de 25 °C, 37 °C, 50 °C e 68 °C; concentrações de tampão de 10XSSC, 6XSSC, 1XSSC, 0,1XSSC (onde SSC é 0,15 M NaCl e 15 mM tampão citrato) e os seus equivalentes que utilizam outros sistemas tampão; concentrações de formamida de 0%, 25%, 50% e 75%; tempos de incubação de 5 minutos a 24 horas; 1, 2 ou mais etapas de lavagem; tempos de incubação de lavagem de 1, 2 ou 15 minutos e soluções de lavagem de

6XSSC, 1XSSC, 0,1XSSC ou água desionizada. Exemplos de condições rigorosas são hibridização e lavagem a 50 °C ou superior e em 0,1XSSC (9 mM de NaCl/0,9 mM de citrato de sódio).

" T_m " é a temperatura em graus Celsius à qual 50% dum duplex polinucleótido feito de hidrogénio de cadeias complementares ligado em direção antiparalela por emparelhamento de bases Watson-Crick se dissocia em cadeias simples sob condições da experiência. T_m pode ser previsto de acordo com uma fórmula padrão, tal como: onde $[X^+]$ é a concentração de catião (normalmente ião de sódio, Na^+), em mol/L; (% G/C) é o número de resíduos de G e C como uma percentagem dos resíduos totais no duplex; (%F) é a percentagem de formamida na solução (p/v) e L é o número de nucleótidos em cada cadeia do duplex.

As condições rigorosas para hibridização tanto de ADN/ADN e ADN/ARN são tal como descrito por Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989, incorporado no presente documento por referência. Por exemplo, ver página 7.52 de Sambrook et al.

O termo "célula hospedeira" inclui uma célula individual ou uma cultura celular que pode ser ou tenha sido um recetor de qualquer vetor(es) recombinante(s) ou polinucleótido isolado da invenção. As células hospedeiras incluem a descendência de uma única célula hospedeira e a descendência pode não ser necessariamente completamente idêntica à célula parental original (em morfologia ou no complemento de ADN total) devido a mutação natural, acidental ou deliberada e/ou alteração. Uma célula hospedeira inclui células transfetadas ou infetadas *in vivo* ou *in vitro* com um vetor recombinante ou um polinucleótido da invenção. Uma célula hospedeira que compreende um vetor recombinante da invenção é uma "célula hospedeira recombinante".

O termo "liga-se especificamente," no contexto de ligação de anticorpo, refere-se a elevada avidéz e/ou a elevada afinidade de ligação dum anticorpo a um polipeptídeo específico, isto é, epítopo dum polipeptídeo APRIL ou BLYS polimórfico. A ligação dum anticorpo a um epítopo num polipeptídeo APRIL ou BLYS específico é preferentemente mais forte que a ligação do mesmo anticorpo a qualquer outro epítopo, particularmente aqueles que podem estar presentes em moléculas em associação com, ou na mesma amostra, como o polipeptídeo específico de interesse, por exemplo, liga-se mais fortemente a um epítopo APRIL ou BLYS específico do que a um epítopo APRIL ou BLYS diferente de modo que, ajustando as condições de ligação, o anticorpo liga-se quase exclusivamente ao epítopo APRIL ou BLYS específico e não a qualquer outro epítopo APRIL ou BLYS. Os anticorpos que se ligam especificamente a um polipeptídeo de interesse podem ser capazes de se ligar a outros polipeptídeos num nível fraco, mas detetável (por exemplo, 10% ou menos da ligação mostrada para o polipeptídeo de interesse). Tal ligação fraca, ou ligação de fundo, é prontamente discernível da ligação do anticorpo específico ao composto ou polipeptídeo de interesse, por exemplo, pela utilização de controlos apropriados. Em geral, os anticorpos da invenção que se ligam a um polipeptídeo APRIL ou BLYS específico com uma afinidade de ligação 10^7 mole/l ou mais, preferentemente 10^8 mole/l ou mais são referidos ligarem-se especificamente ao polipeptídeo APRIL ou BLYS específico. Em geral, um anticorpo com uma afinidade de ligação de 10^6 mole/litros ou menos não é útil na medida em que não irá ligar-se a um antígeno num nível detetável utilizando a metodologia convencional atualmente utilizada.

O termo "anticorpo monoclonal" como utilizado no presente documento refere-se a um anticorpo obtido duma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população

são idênticos exceto quanto a possíveis mutações que ocorrem naturalmente e que podem estar presentes em quantidades menores.

Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antígeno. Além disso, em contraste com preparações de anticorpo (policlonal) convencionais que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Adicionalmente à sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos na medida em que são sintetizados pela cultura de hibridoma, não contaminada por outras imunoglobulinas. O "monoclonal" modificador indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não é para ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de ADN recombinante (ver, por exemplo, Patente U.S. N.º 4 816 567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos de fagos utilizando as técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol.Biol.*, 222: 581-597 (1991), por exemplo.

Os anticorpos monoclonal no presente documento incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie determinada ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies

ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente U.S. N.º 4 816 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81: 6851-6855 (1984)). Métodos de produzir anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antígeno) as quais contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana.

Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recetor) nos quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do recetor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como ratinho, ratazana ou coelho que possuem a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, resíduos da região estrutural (FR) de Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo recetor nem na CDR ou nas sequências estruturais importadas. Estas modificações são feitas para refinar e maximizar mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as loops hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana, embora as regiões FR possam incluir uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram a afinidade de ligação. O número destas substituições de aminoácido na FR são tipicamente não mais

do que 6 na cadeia H e na cadeia L, não mais do que 3. O anticorpo humanizado otimamente compreenderá também pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988) e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo PRIMATIZADO em que a região de ligação ao antígeno do anticorpo é derivada dum anticorpo produzido por, por exemplo, imunização de macacos macaca com o antígeno de interesse. Os métodos para produzir anticorpos humanizados são conhecidos na técnica.

Os anticorpos humanos também podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade, incluindo bibliotecas de apresentação de fagos. Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* também estão disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos. Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991).

"Fragmentos funcionais" dos anticorpos de ligação da invenção são aqueles fragmentos que retêm a ligação a BLyS, TACI, BAFF-R ou BCMA com substancialmente a mesma afinidade que a molécula de cadeia completa intacta a partir da qual são derivados e podem ser capazes de esgotar as células B conforme medido *in vitro* ou em ensaios *in vivo* tais como os descritos no presente documento.

O anticorpo "funções efetoras" refere-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc variante de sequência de aminoácidos) de um anticorpo e variam com o isotipo de anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem: ligação Clq e citotoxicidade dependente do complemento; ligação ao recetor de Fc; citotoxicidade

mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; regulação negativa de recetores de superfície das células (por exemplo, recetor de célula B) e ativação de células B.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo" ou "ADCC" refere-se a uma forma de citotoxicidade na qual Ig segregada ligada a recetores Fc (FcRs) presentes em certas células citotóxicas (por exemplo, células *Natural Killer* (NK), neutrófilos e macrófagos) permite que estas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo que transporta de antígeno e subsequentemente matem a célula-alvo com citotoxinas. As células citotóxicas "arma" dos anticorpos e são absolutamente necessárias para tal matança. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está resumida no Quadro 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Ann. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode ser realizado um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como descrito na Patente U.S. N.º 5 500 362 ou 5 821 337. As células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o divulgado em Clynes *et al.* PNAS (EUA) 95: 652-656 (1998).

"Citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação da via clássica do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse apropriada) os quais estão ligados ao seu antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento pode ser realizado um ensaio de CDC

tal como descrito, por exemplo, em Gazzano- Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado duma componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações de diagnóstico ou terapêutica para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% por peso de anticorpo tal como determinado pelo método de Lowry e muito preferivelmente em mais do que 99% por peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos do N-terminal ou sequência de aminoácidos interna utilizando um sequenciador de copo rotativo ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie ou preferentemente, corante de prata.

O Anticorpo Isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Habitualmente, contudo, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

Os termos "anticorpo marcado detetavelmente" referem-se a um anticorpo (ou fragmento de anticorpo que retém especificidade de ligação para um polipeptídeo ou epítopo APRIL), tendo um marcador detetável fixado. O marcador detetável é normalmente fixado por conjugação química, mas quando o marcador é um polipeptídeo, pode ser fixado alternativamente por técnicas de engenharia genética. Os métodos para produção de proteínas marcadas detetáveis são bem conhecidos na técnica. Os marcadores detetáveis podem ser selecionados a partir de uma variedade de tais marcadores conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, radioisótopos, fluoróforos, marcadores

paramagnéticos, enzimas (por exemplo, peroxidase de raiz-forte) ou outras frações ou compostos que ou emitem um sinal detetável (por exemplo, radioatividade, fluorescência, cor) ou emitem um sinal detetável após a exposição do marcador ao seu substrato. Vários pares detetáveis marcador/substrato (por exemplo, peroxidase de raiz-forte silvestre/diaminobenzidina, avidina/estreptavidina, luciferase/luciferina)), os métodos para marcação de anticorpos e métodos para utilização de anticorpos marcados são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Harlow e Lane, edições. (Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque)).

Uma "amostra biológica" abrange uma variedade de tipos de amostra obtidos dum indivíduo e pode ser utilizada num ensaio de diagnóstico ou monitorização. A definição abrange sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras de tecido sólido, tais como um espécime de biopsia ou culturas de tecidos ou células delas derivadas e a progénie das mesmas. A definição inclui também amostras que foram manipuladas de alguma forma após a sua colheita, tal como por tratamento com reagentes, solubilização ou enriquecimento de certos componentes, tais como polinucleótidos. O termo "amostra biológica" abrange uma amostra clínica e inclui também cultura celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, soro, plasma, fluido biológico e amostras de tecido.

Como utilizado no presente documento, os termos "tratamento", "tratar" e semelhantes, referem-se à obtenção dum efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completamente ou parcialmente uma doença ou sintoma da mesma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. "Tratamento", como utilizado no

presente documento, cobre qualquer tratamento duma doença num mamífero, particularmente num ser humano e inclui: (a) prevenir a doença de ocorrer num sujeito que possa estar predisposto à doença mas ainda não foi diagnosticado como a tendo; (B) inibir a doença, isto é, parar o seu desenvolvimento e (c) aliviar a doença, isto é, provocar a regressão da doença.

Os "Fármacos imunossupressores" são quaisquer moléculas que interferem com o sistema imunitário e limitam a sua resposta a antígenos estranhos ou próprios. A ciclofosfamida (CYC) e o micofenolato de mofetil (MMF) são dois desses tipos de moléculas. Este termo pretende abranger qualquer fármaco ou molécula útil como um agente terapêutico na regulação para baixo do sistema imunitário.

Uma "proteína de fusão" e um "polipeptídeo de fusão" referem-se a um polipeptídeo que tem duas porções ligadas covalentemente entre si, em que cada uma das porções é um polipeptídeo que tem uma propriedade diferente. A propriedade pode ser uma propriedade biológica, tal como atividade *in vitro* ou *in vivo*. A propriedade também pode ser uma propriedade química ou física simples, tal como a ligação a uma molécula alvo, catálise duma reação, etc. As duas porções podem estar ligadas diretamente por uma única ligação peptídica ou através de um ligante peptídico que contém um ou mais resíduos de aminoácido. Geralmente, as duas porções e o ligante estarão em quadro de leitura umas com as outras.

Um "conjugado" refere-se a qualquer molécula híbrida, incluindo proteínas de fusão e bem como moléculas que contêm ambos aminoácido ou porções de proteínas e porções não proteicas. Os conjugados podem ser sintetizados por uma variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, técnicas de ADN recombinante, síntese em fase sólida, síntese em fase de solução, técnicas sintéticas de química orgânica ou uma combinação destas técnicas. A

escolha da síntese dependerá da molécula particular a ser gerada. Por exemplo, uma molécula híbrida não inteiramente "proteína" na natureza, pode ser sintetizada por uma combinação de técnicas recombinantes e técnicas de fase de solução.

Como utilizado no presente documento, o termo "Proteína de fusão Fc" designa moléculas do tipo anticorpo que combinam a especificidade de ligação dum proteína heteróloga com as funções efetoras dos domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as proteínas de fusão de Fc compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é outra que não o reconhecimento do antígeno e o local de ligação dum anticorpo (isto é, é "heterólogo") e uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A molécula de Proteína de fusão Fc inclui tipicamente uma sequência de aminoácidos contígua que compreende pelo menos o local de ligação dum recetor ou um ligando. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na Proteína de fusão Fc pode ser obtida de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM. Por exemplo, proteínas de fusão de Fc úteis de acordo com esta invenção são polipeptídeos que compreendem as porções de ligação dum recetor BLYS, sem as sequências transmembranar ou citoplasmáticas do recetor BLYS. Numa forma de realização, o domínio extracelular de BAFF-R, TACI ou BCMA é fundido com um domínio constante de uma sequência de imunoglobulina.

Os termos "indivíduo," "sujeito," e "paciente," utilizados de forma intersubstituível no presente documento, referem-se a um mamífero incluindo, mas não limitado a, murinos, símios, seres humanos, animais de quinta mamíferos, animais de desporto mamífero e animais de estimação mamíferos.

O termo "mamífero" refere-se a qualquer animal

classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de quinta e animais do zoológico, de desportos ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, o mamífero no presente documento é um ser humano.

A Detecção de HT (Polipeptídeos APRIL e BLYS)

A presente invenção proporciona a detecção de polipeptídeos HT através da medição separada de polipeptídeos APRIL e BLYS. O termo "polipeptídeo APRIL" abrange uma sequência de aminoácidos codificada por um quadro de leitura aberta (ORF) dum polinucleótido de APRIL conhecido (tal como os disponíveis publicamente, Número de Acesso GenBank: AF046888), incluindo o polipeptídeo nativo de comprimento completo e fragmentos do mesmo, particularmente os fragmentos biologicamente ativos e/ou fragmentos correspondentes a domínios funcionais, por exemplo, uma região ou domínio que tem atividade biológica, etc., fragmentos antígenos dos mesmos e que incluem fusões de polipeptídeos do sujeito a outras proteínas ou partes das mesmas. As sequências de aminoácidos dos polipeptídeos APRIL foram divulgadas. (Ver, por exemplo, Hahne *et al.*, J. Exp. Med. 188: 1185-90, 1998). Os polipeptídeos APRIL podem ser isolados duma variedade de fontes, tal como de tipos de tecido de ser humano ou doutra fonte ou preparados por métodos recombinantes e/ou sintéticos. Um polimorfismo num polipeptídeo APRIL é geralmente definido relativamente a uma sequência de referência.

O termo "polipeptídeo BLYS" abrange uma sequência de aminoácidos codificada por um quadro de leitura aberta (ORF) dum polinucleótido BLYS conhecido (tal como os disponíveis publicamente através do GenBank ou os seus complementos: N.º de Acesso NM 052945 (ARNm BLYS humano) ou as suas variantes humanas N.ºs de Acesso 003808, 172087, 172088 ou N.º de Acesso 033622 (mARN BLYS de ratinho)), que inclui polipeptídeo nativo de comprimento completo e

fragmentos do mesmo, particularmente os fragmentos biologicamente ativos e/ou fragmentos correspondentes a domínios funcionais, por exemplo, uma região ou domínio que tem atividade biológica, etc., fragmentos antígenos dos mesmos e que incluem fusões de polipeptídeos do sujeito a outras proteínas ou partes das mesmas. As sequências de aminoácidos dos polipeptídeos BLYS foram divulgadas. (Ver, por exemplo, Moore *et al.* Science 285: 260-3, 1999). Os polipeptídeos BLYS podem ser isolados duma variedade de fontes, tal como de tipos de tecido de ser humano ou doutra fonte ou preparados por métodos recombinantes e/ou sintéticos. Um polimorfismo num polipeptídeo BLYS é geralmente definido relativamente a uma sequência de referência.

Como utilizado no presente documento, "polipeptídeo APRIL polimórfico" refere-se a uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo recombinante ou não recombinante que tem uma sequência de aminoácidos de i) um polipeptídeo APRIL polimórfico nativo, ii) um fragmento dum polipeptídeo APRIL polimórfico, iii) análogos de polipeptídeos dum polipeptídeo APRIL polimórfico, iv) variantes dum polipeptídeo APRIL polimórfico; v) um fragmento imunologicamente ativo dum polipeptídeo APRIL polimórfico e vi) proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo APRIL polimórfico. Os polipeptídeos APRIL polimórficos da invenção podem ser obtidos a partir duma amostra biológica ou a partir de qualquer fonte quer seja natural, sintética, semissintética ou recombinante.

Como utilizado no presente documento, "polipeptídeo BLYS polimórfico" refere-se a uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo recombinante ou não recombinante que tem uma sequência de aminoácidos de i) um polipeptídeo BLYS polimórfico nativo, ii) um fragmento dum polipeptídeo BLYS polimórfico, iii) análogos de polipeptídeos dum polipeptídeo BLYS polimórfico, iv) variantes dum

polipeptídeo BLYS polimórfico; v) um fragmento imunologicamente ativo dum polipeptídeo BLYS polimórfico e vi) proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo BLYS polimórfico. Os polipeptídeos BLYS polimórficos da invenção podem ser obtidos a partir duma amostra biológica ou a partir de qualquer fonte quer seja natural, sintética, semissintética ou recombinante.

O termo "polipeptídeo BLYS" ou "polipeptídeo APRIL" abrange um polipeptídeo que compreende pelo menos cerca de 5 aminoácidos, pelo menos cerca de 10 aminoácidos, pelo menos cerca de 15 aminoácidos, pelo menos cerca de 25 aminoácidos, pelo menos cerca de 50 aminoácidos, pelo menos cerca de 75 aminoácidos, pelo menos cerca de 100 aminoácidos, pelo menos cerca de 200 aminoácidos, pelo menos cerca de 300 aminoácidos, pelo menos cerca de 400 aminoácidos ou até todo o polipeptídeo dum polipeptídeo APRIL ou BLYS polimórfico. Em certas formas de realização, um polipeptídeo APRIL ou BLYS polimórfico exibe atividade biológica, por exemplo, o polipeptídeo causa proliferação de células B e produção de imunoglobulina num ensaio *in vitro*. Outros ensaios para a atividade biológica de APRIL ou BLYS são conhecidos na técnica e podem ser utilizados para determinar se um polipeptídeo APRIL ou BLYS polimórfico exibe atividade biológica e, se desejado, a quantidade de atividade biológica de APRIL ou BLYS. Os ensaios biológicos de APRIL ou BLYS são descritos em várias publicações, por exemplo, Moore et al., supra.

Os polipeptídeos APRIL podem ser obtidos por qualquer método conhecido ou por uma combinação de tais métodos, que incluem o isolamento a partir de fontes naturais, produção por síntese química e produção por técnicas recombinantes padrão. Os polipeptídeos APRIL podem ser isolados a partir de uma "fonte biológica, utilizando cromatografia de afinidade, por exemplo, utilizando anticorpos específicos para um polipeptídeo APRIL imobilizados num suporte sólido.

Os polipeptídeos podem ser expressos em procariotas ou eucariotas de acordo com maneiras convencionais, dependendo do propósito para a expressão. Para uma produção em larga escala da proteína, um organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de inseto em combinação com vetores de *baculovirus* ou células dum organismo superior tal como vertebrados, particularmente mamíferos, por exemplo, células COS 7, células CHO, células HEK293 e afins, podem ser utilizadas como células hospedeiras de expressão. Nalgumas situações, é desejável expressar o gene em células eucariotas onde a proteína irá beneficiar de dobragem nativa e modificações pós-translacionais. O polipeptídeo pode então ser isolado a partir do sobrenadante de cultura celular ou de lisados celulares utilizando métodos de cromatografia de afinidade a partir de métodos de cromatografia de exclusão de permuta aniónica/tamanho, tal como acima descrito.

Com a disponibilidade da proteína ou dos fragmentos da mesma em grandes quantidades, empregando um hospedeiro de expressão, a proteína pode ser isolada e purificada de acordo com maneiras convencionais. Pode ser preparado um lisado do hospedeiro de expressão e o lisado purificado utilizando HPLC, cromatografia de exclusão, eletroforese em gel, cromatografia de afinidade ou outra técnica de purificação. As proteínas isoladas podem ser utilizadas para produzir anticorpos, que são, por sua vez, utilizados para detetar a presença da referida proteína utilizando sistemas de ensaio padrão, por exemplo, ELISA ou análise de FACS.

Preparação de Polipeptídeos APRIL e BLyS

Adicionalmente à pluralidade de utilizações descritas com grande detalhe nas secções seguintes, as composições de ácido nucleico APRIL são utilizadas na preparação da totalidade ou duma porção de polipeptídeos APRIL, como descrito acima. Os polinucleótidos (incluindo ADNc ou o

gene de comprimento completo) são utilizados para expressar um produto de gene parcial ou completo. As construções que compreendem os polinucleótidos sujeitos podem ser geradas sinteticamente. Alternativamente, a montagem dum etapa única dum gene e de todo o plasmídeo a partir de grandes números de oligodesoxirribonucleótidos é descrita por, por exemplo, Stemmer *et al.*, *Gene* (Amsterdão) (1995) 164(1):49-53. Neste método é descrita a montagem PCR (a síntese de sequências de ADN longas a partir de um grande número de oligodesoxirribonucleótidos (oligos)). O método deriva de misturar ADN (Stemmer, *Nature* (1994) 370:389-391), e não depende de ligase de ADN, mas em vez disso depende de polimerase de ADN para construir fragmentos de ADN cada vez mais longos durante o processo de montagem. Construções polinucleótidas apropriadas são purificadas utilizando técnicas de ADN recombinante padrão como descrito em, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque e sob os regulamentos atuais descritos no Departamento de HHS dos Estados Unidos, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinant DNA Research.

Em particular pode ser necessário proporcionar meios de engenharia de trimerização da proteína APRIL ou da proteína BLyS a fim de ser capaz de produzir quantidades suficientes de proteína ativa para produzir anticorpos eficazes. Exemplos de trimerização de polipeptídeos tal como a sequência ZymoZipper são divulgados no Pedido de Patente U.S. Série N.º 11/530 672 e as referências nele discutidas. Este tipo de polipeptídeos de trimerização também são úteis para a produção de proteína padrão HT APRIL/BLyS para utilização no ensaio (ver Exemplo 1).

As moléculas polinucleótido que compreendem uma sequência polinucleótida proporcionada no presente documento são propagadas colocando a molécula num vetor.

São utilizados vetores virais e não virais, incluindo plasmídeos. A escolha do plasmídeo dependerá do tipo de célula na qual se deseja a propagação e o propósito da propagação. Certos vetores são úteis para amplificar e produzir grandes quantidades da sequência de ADN desejada. Outros vetores são adequados para a expressão em cultura celular. Ainda outros vetores são adequados para a transferência e expressão em células num animal ou pessoa inteiros. A escolha do vetor apropriado está bem dentro da perícia da especialidade. Muitos desses vetores estão disponíveis comercialmente. O polinucleótido de comprimento parcial ou completo é inserido num vetor tipicamente por meio de fixação de ligase de ADN a um local de enzima de restrição clivado no vetor. Alternativamente, a sequência de nucleótido desejada pode ser inserida por recombinação homóloga *in vivo*. Tipicamente, isto é conseguido pela fixação de regiões de homologia com o vetor nos flancos da sequência de nucleótido desejada. As regiões de homologia são adicionadas por ligação de oligonucleótidos ou por reação em cadeia de polimerase utilizando iniciadores que compreendem tanto a região de homologia como uma porção da sequência de nucleótido desejada, por exemplo.

Para a expressão, pode ser empregue uma cassete ou sistema de expressão. O produto do gene codificado por um polinucleótido da invenção é expresso em qualquer sistema de expressão conveniente, incluindo, por exemplo, bacteriano, levedura, inseto, sistemas de anfíbios e de mamíferos. Os vetores e as células hospedeiras adequados são descritos na Patente U.S. N.º 5 654 173. No vetor de expressão, um polinucleótido que codifica um polipeptídeo APRIL está ligado a uma sequência reguladora apropriada para se obter as propriedades de expressão desejadas. Estes podem incluir promotores (fixados quer à extremidade 5' da cadeia de sentido ou à extremidade 3' da cadeia de anti-sentido), potenciadores, terminadores, operadores,

repressores e indutores. Os promotores podem ser regulados ou constitutivos. Em algumas situações pode ser desejável utilizar condicionalmente promotores ativos, tais como promotores específicos de tecido ou específico de etapa de desenvolvimento. Estes estão ligados à sequência nucleótida desejada utilizando as técnicas descritas acima para ligação a vetores. Quaisquer técnicas conhecidas na especialidade podem ser utilizado. Por outras palavras, o vetor de expressão irá proporcionar uma região de iniciação da transcricional e translacional, que pode ser indutível ou constitutiva, em que a região de codificação está ligada operacionalmente sob o controlo transcricional da região de iniciação transcricional e uma região de terminação transcricional e translacional. Estas regiões de controlo podem ser nativas para o gene de APRil ou podem ser derivadas a partir de fontes exógenas.

Os vetores de expressão têm geralmente locais de restrição convenientes localizados perto da sequência do promotor para proporcionar a inserção de sequências de ácido nucleico que codificam proteínas heterólogas. Pode estar presente um operativo marcador selecionável no hospedeiro de expressão. Os vetores de expressão podem ser utilizados para a produção de proteínas de fusão em que o péptido de fusão exógeno proporciona funcionalidade adicional, isto é, aumento da síntese de proteínas, de estabilidade, de reatividade com antissoros definidos, um marcador de enzima, por exemplo, β -galactosidase, etc.

As cassetes de expressão podem ser preparadas compreendendo uma região de iniciação de transcrição, o gene ou o fragmento do mesmo e uma região de terminação transcricional. De particular interesse é a utilização de sequências que permitem a expressão de epítomos ou domínios funcionais, normalmente pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento, mais normalmente pelo menos cerca de 15 aminoácidos de comprimento a cerca de 25 aminoácidos e até

ao completo quadro de leitura aberta do gene. Após a introdução do ADN, as células que contêm a construção podem ser selecionadas por meio dum marcador de seleção, as células expandidas e, em seguida, utilizadas para a expressão.

Os polipeptídeos APRIL podem ser expressos em procariotas ou eucariotas de acordo com maneiras convencionais, dependendo do propósito para a expressão. Para uma produção em larga escala da proteína, um organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de inseto em combinação com vetores de *baculovirus* ou células dum organismo superior tal como vertebrados, particularmente mamíferos, por exemplo, células COS 7, HEK293, CHO, *Xenopus Oocytes*, etc., podem ser utilizadas como células hospedeiras de expressão. Nalgumas situações, é desejável expressar uma molécula de ácido nucleico APRIL polimórfica em células eucariotas onde a proteína APRIL polimórfica irá beneficiar de dobragem nativa e modificações pós-translacionais. Pequenos péptidos também podem ser sintetizados no laboratório. Os polipeptídeos que são subconjuntos da sequência APRIL completa podem ser utilizados para identificar e investigar partes da proteína importante para a função.

Os sistemas de expressão específicos de interesse incluem bacteriano, levedura, células de inseto e sistemas de expressão derivados de células de mamíferos. Os sistemas representativos de cada uma destas categorias são proporcionados abaixo:

Bactérias. Os sistemas de expressão em bactérias incluem os descritos em Chang et al., Nature (1978) 275:615; Goeddel et al., Nature (1979) 281:544; Goeddel et al., Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057; documento EP 0 036 776; Patente U.S. N.º 4 551 433; DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) (1983) 80:21-25 e Siebenlist et al., Cell (1980) 20:269.

Levedura. Os sistemas de expressão em leveduras incluem os descritos em Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) (1978) 75:1929; Ito *et al.*, J. Bacteriol. (1983) 153:163; Kurtz *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1986) 6:142; Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. (1985) 25:141; Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. (1986) 132:3459; Roggenkamp *et al.*, Mol. Gen. Genet. (1986) 202:302; Das *et al.*, J. Bacteriol. (1984) 158:1165; De Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol. (1983) 154:737; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology (1990) 8:135; Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. (1985) 25:141; Cregg *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1985) 5:3376; Patentes U.S. N.ºs 4 837 148 e 4 929 555; Beach e Nurse, Nature (1981) 300:706; Davidow *et al.*, Curr. Genet. (1985) 10:380; Gaillardin *et al.*, Curr. Genet. (1985) 10:49; Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112:284-289; Tilburn *et al.*, Gene (1983) 26:205-221; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) (1984) 81:1470-1474; Kelly e Hynes, EMBO J. (1985) 4:475479; documento EP 0 244 234 e o documento WO 91/00357.

Células de inseto. A expressão de genes heterólogos em insetos é realizada como descrito em Patente U.S. N.º 4 745 051; Friesen *et al.*, "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", em: The Molecular Biology Of Baculoviruses (1986) (W. Doerfler, ed.); documento EP 0 127 839; documento EP 0 155 476 e Vlak *et al.*, J. Gen. Virol. (1988) 69:765-776; Miller *et al.*, Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:177; Carbonell *et al.*, Gene (1988) 73:409; Maeda *et al.*, Nature (1985) 315:592-594; Lebacqz-Verheyden *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1988) 8:3129; Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) (1985) 82:8844; Miyajima *et al.*, Gene (1987) 58:273 e Martin *et al.*, DNA (1988) 7:99. Numerosas estirpes e variantes de *baculovirus* e correspondentes células hospedeiras de inseto permissivas de hospedeiros são descritas em Luckow

et al., Bio/Technology (1988) 6:47-55, Miller et al., Generic Engineering (1986) 8:277-279 e Maeda et al., Nature (1985) 315:592-594.

Células de Mamífero. A expressão de mamífero é realizada como descrito em Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4:761, Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) (1982) 79:6777, Boshart et al., Cell (1985) 41:521 e Patente U.S. N.º 4 399 216. Outras características de expressão de mamífero são facilitadas como descrito em Ham e Wallace, Meth. Enz. (1979) 58:44, Barnes e Sato, Anal. Biochem. (1980) 102:255, Patentes U.S. N.ºs 4 767 704, 4 657 866, 4 927 762, 4 560 655, documento WO 90/103430, documento WO 87/00195 e Patente U.S. N.º RE 30 985.

Quando qualquer uma das células hospedeiras acima ou outras células hospedeiras ou organismos apropriados são utilizados para replicar e/ou expressar polinucleótidos ou ácidos nucleicos descritos no presente documento, o ácido nucleico replicado resultante, ARN, proteína ou polipeptídeo expresso, é descrito no presente documento como um produto da célula hospedeira ou do organismo. O produto é recuperado por quaisquer meios apropriados conhecidos na técnica.

Uma vez que o gene correspondente a um polinucleótido selecionado é identificado, a sua expressão pode ser regulada na célula da qual o gene é nativo. Por exemplo, um gene endógeno de uma célula pode ser regulado por uma sequência reguladora exógena inserida no genoma da célula na posição suficiente para, pelo menos, melhorar a expressão do gene na célula. A sequência reguladora pode ser concebida para se integrar no genoma através da recombinação homóloga, como divulgado na Patentes U.S. N.ºs. 5 641 670 e 5 733 761, ou pode ser concebida para se integrar no genoma por recombinação não homóloga, como descrito no documento WO 99/15650. Como tal, também é descrito no presente documento a produção de proteínas

APRIL, sem manipulação do próprio ácido nucleico codificado, mas em vez disso, através da integração de uma sequência reguladora no genoma de célula que já inclui um gene que codifica a proteína desejada, como descrito nos documentos de patentes acima incorporados.

Preparação de Anticorpos Específicos para Polipeptídeos APRIL e BLYS

Os métodos *in vitro* da invenção utilizam anticorpos, particularmente anticorpos isolados, que são específicos para polipeptídeos APRIL e BLYS. Os anticorpos são úteis numa variedade de ensaios de diagnóstico, como descrito abaixo com mais detalhes. Por exemplo, os anticorpos podem ser utilizados para detetar e/ou medir os níveis de HT numa amostra biológica.

Os polipeptídeos APRIL e BLYS isolados são úteis para a produção de anticorpos, onde fragmentos curtos proporcionam anticorpos específicos para o polipeptídeo particular e fragmentos maiores ou a proteína inteira permitem a produção de anticorpos sobre a superfície do polipeptídeo. Em conformidade, os métodos da presente invenção utilizam anticorpos isolados que se ligam especificamente a um polipeptídeo APRIL, ou um fragmento antigénico do mesmo. Os anticorpos podem ser criados para o tipo selvagem ou formas variantes. Os anticorpos podem ser criados para péptidos isolados correspondentes a estes domínios ou para a proteína nativa. Os anticorpos podem ser criados para polipeptídeos e/ou fragmentos peptídicos de APRIL de qualquer espécie de mamífero. Como um exemplo não limitativo, um ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) pode ser utilizado para determinar a especificidade de um dado anticorpo monoclonal para um polipeptídeo APRIL ou BLYS.

Os polipeptídeos APRIL e BLYS são úteis para a produção de anticorpos, onde fragmentos curtos proporcionam anticorpos específicos para o polipeptídeo particular e

fragmentos maiores ou a proteína inteira permitem a produção de anticorpos sobre a superfície do polipeptídeo. Como utilizado no presente documento, o termo "anticorpos" inclui anticorpos de qualquer isotipo, fragmentos de anticorpos que retêm a ligação específica ao antígeno, incluindo, mas não limitado a, fragmentos Fab, Fv, scFv e Fd, proteínas de fusão que compreendem tais fragmentos de anticorpo, anticorpos marcados de forma detetável e anticorpos quiméricos. "Especificidade de anticorpo", no contexto das interações anticorpo-antígeno, é um termo bem compreendido na especialidade, e indica que um dado anticorpo se liga a um dado antígeno, em que a ligação pode ser inibida por esse antígeno ou um epítipo do mesmo que é reconhecido pelo anticorpo e não se liga substancialmente a antígenos não relacionados. Os métodos de determinação da ligação a anticorpo específico são bem conhecidos dos peritos na especialidade e podem ser utilizados para determinar a especificidade dos anticorpos para um polipeptídeo APRIL ou BLyS.

Os anticorpos são preparados de acordo com maneiras convencionais, em que a expresso é polipeptídeo ou proteína é utilizado como um imunogénio, sozinho ou conjugado com veículos imunogénicos conhecidos, por exemplo KLH, pre-S HBsAg, outras proteínas virais ou eucarióticas ou semelhantes. Podem ser empregues vários adjuvantes, com uma série de injeções, conforme for apropriado. Para os anticorpos monoclonais, depois de uma ou mais injeções de reforço, o baço é isolado, os linfócitos imortalizados por fusão celular e depois rastreados para ligação de anticorpo de elevada afinidade. As células imortalizadas, isto é, hibridomas que produzem os anticorpos desejados, podem então ser expandidas. Para uma descrição adicional ver *Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1988. Se desejado, o mARN que codifica as

cadeias pesada e leve pode ser isolado e mutagenizados por clonagem em *E. coli* e as cadeias pesada e leve misturadas para melhorar ainda mais a afinidade do anticorpo. Alternativas a imunização *in vivo* como um método de criação de anticorpos incluem ligação a bibliotecas de apresentação de fagos, normalmente em conjunto com a maturação de afinidade *in vitro*.

Os anticorpos podem ser fixados, diretamente ou indiretamente (por exemplo, através duma molécula de ligação) a um suporte sólido para utilização num ensaio de diagnóstico para determinar e/ou medir a presença de HT numa amostra biológica. A fixação é geralmente covalente, embora não necessite de ser. Os suportes sólidos incluem, mas não estão limitados a, contas (por exemplo, esferas de poliestireno, esferas magnéticas e outras semelhantes); superfícies plásticas (por exemplo, placas multi-poços de poliestireno ou policarbonato tipicamente utilizadas num ELISA ou radioimunoensaio (RIA) e semelhantes); folhas, por exemplo, *nylon*, nitrocelulose e semelhantes; e lascas, por exemplo, lascas de SiO₂, tais como as utilizadas em micro arranjos. Em conformidade, a invenção proporciona ainda dispositivos de ensaio que compreendem anticorpos ligados a um suporte sólido.

Um único anticorpo ou uma bateria de anticorpos diferentes pode então ser utilizado para criar um dispositivo de ensaio. Um tal dispositivo de ensaio pode ser preparado utilizando tecnologia convencional conhecida dos peritos na especialidade. O anticorpo pode ser purificado e isolado utilizando técnicas conhecidas e ligado a uma superfície de suporte que utiliza procedimentos conhecidos. A superfície resultante que tem anticorpo ligado nela pode ser utilizada para ensaiar uma amostra de teste, por exemplo, uma amostra biológica, *in vitro*, para determinar se a amostra contém um ou mais tipos de moléculas HT. Por exemplo, anticorpos que se ligam

apenas a um epítopo HT específico que pode ser fixado à superfície de um material. Alternativamente, podem ser utilizados uma pluralidade de anticorpos específicos, que podem ser arrançados numa matriz, em que anticorpos específicos para dois ou mais epítopos diferentes HT são fixados ao suporte sólido. Uma amostra de teste é posta em contacto com os anticorpos ligados à superfície do material. A ligação específica pode ser detetada utilizando qualquer método conhecido. Se a ligação específica não é detetada, pode-se deduzir que a amostra não contém o epítopo HT específico. Como um exemplo não limitativo de como a ligação específica pode ser detetada, uma vez a amostra de ensaio tenha sido posta em contacto com os anticorpos ligados ao suporte sólido, um segundo anticorpo marcado detetável pode ser adicionado, o qual reconhece um epítopo HT distinto do epítopo reconhecido pelo anticorpo ligado ao suporte sólido.

Uma variedade de outros reagentes pode ser incluída nos ensaios para detetar olipeptídeos HT descritos no presente documento. Estes incluem reagentes tais como sais, proteínas neutras, por exemplo albumina, detergentes, etc. que são utilizados para facilitar a ligação proteína-proteína ótima e/ou reduzir as interações não específicas ou de fundo. Podem ser utilizados reagentes que melhorem a eficiência do ensaio, tais como inibidores de protease, agentes anti-microbianos, etc. Os componentes são adicionados em qualquer ordem que proporcione a ligação requerida. As incubações são realizadas a qualquer temperatura adequada, tipicamente entre 4 °C e 40 °C. Os períodos de incubação são selecionados para atividade ótima, mas também podem ser otimizados para facilitar um rastreio de alto rendimento rápido. Tipicamente será suficiente entre 0,1 e 1 hora.

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos

diferentes. Os anticorpos biespecíficos exemplares podem ligar-se a dois epítomos diferentes do marcador de superfície da célula B. Outros desses anticorpos podem ligar-se a um primeiro marcador de célula B e ligar-se ainda a um segundo marcador de superfície de célula B. Em alternativa, um braço de ligação de marcador anti-células B pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula desencadeadora num leucócito tal como uma molécula recetora de células T (por exemplo CD2 ou CD3) ou recetores Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo a focar os mecanismos de defesa celular para a célula B. Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para a célula B. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a marcador de célula B e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferão, alcalóides da vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo).

Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')₂). Os métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento completo baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, em que as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)).

Por causa do sortido aleatório de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante complicada e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos semelhantes são

divulgados no documento WO93/08829 e em Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de antígeno-anticorpo) são fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. Preferivelmente a fusão é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende pelo menos parte da dobradiça, regiões CH2 e CH3. É preferível que tenha a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) que contém o local necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. As fusões de cadeia pesada de imunoglobulina que codificam ADNs e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são co-transfetados para um organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em formas de realização quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam os rendimentos excelentes. No entanto, é possível inserir as sequências de codificação para duas ou para as três cadeias polipeptídicas num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em razões iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as razões não têm significado particular.

Numa forma de realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida no outro braço (proporcionando uma segunda especificidade de ligação). Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de

uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica proporciona uma maneira fácil de separação. Esta abordagem é divulgada no documento WO 94/04690. Para detalhes adicionais de geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986). De acordo com outra abordagem descrita na Patente U.S. N.º 5 731 168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura celular recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 dum domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácido da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante à(s) cadeia(s) lateral(ais) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo por substituição de cadeias laterais grandes de aminoácido por outras mais pequenas (por exemplo, alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugado". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Tais anticorpos foram, por exemplo, propostos para dirigir células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente U.S. N.º 4 676 980) e para tratamento de infecção por HIV (o documento WO 91/00360, o documento WO 92/200373 e documento EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes de reticulação são bem conhecidos na técnica, e são divulgados na Patente U.S. N.º 4 676 980, juntamente com várias técnicas de

reticulação.

As técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados utilizando ligação química. Brennan *et al*, Science, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos F(ab')₂. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiol de arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

O progresso recente facilitou a recuperação direta de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) descrevem a produção duma molécula F(ab')₂ de anticorpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi segregado separadamente a partir de *E. coli* e submetido a acoplamento químico direto *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobre-expressam o recetor ErbB2 e células T humanas normais, bem como desencadear a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor da mama em humanos.

Também foram descritas várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente a partir de cultura celular recombinantes. Por exemplo, os

anticorpos biespecíficos foram produzidos utilizando zíperes de leucina. Kostelny *et al*, J. Immunol, 148 (5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab de dois anticorpos diferentes por fusão de genes.

Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de charneira para formar monómeros e depois reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo.

A tecnologia de "diabody" descrita por Hollinger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 90: 6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) por um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Em conformidade, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios VL e VH complementares de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação ao antígeno. Também foi relatada outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos pela utilização de dímeros Fv (sFv) de cadeia única. Ver Gruber *et al*, J. Immunology., 152: 5368 (1994). Os anticorpos com mais de duas valências estão também contemplados. Por exemplo, os anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tuttet *et al*., J. Immunol. 147: 60 (1991).

Ensaio de Diagnóstico

A especificação descreve métodos para detecção da presença e/ou um nível de mARN HT numa amostra biológica e métodos para detecção da presença e/ou um nível de polipeptídeo de HT numa amostra biológica.

A invenção envolve a detecção em série de cada

subunidade individual na amostra, de tal maneira que apenas as moléculas HT irão ser detetadas. Isto é feito utilizando um processo que é uma adaptação de como um ELISA padrão funciona. Em particular, um anticorpo quer para APRIL ou BLYS é imobilizado (por exemplo, fixado a uma conta) e a amostra é posta em contacto com este anticorpo. Essas moléculas que compreendem a subunidade para a qual o anticorpo é específico ligar-se-ão, enquanto que aqueles homotrímeros que não incluem essa subunidade serão lavados. As moléculas ligadas, serão então postas em contacto com um anticorpo (marcado) detetável para a segunda subunidade (por exemplo, biotinilado) e aquelas moléculas que primeiro foram capturadas que também incluem a segunda subunidade (isto é, aquelas moléculas que são HT) irão ser detetadas. Mais especificamente, se o primeiro anticorpo é contra APRIL, todas as moléculas BLYS homotrímericas serão lavadas na primeira etapa. Quando estas moléculas são contactadas com o segundo anticorpo que é específico para BLYS, todas as moléculas APRIL homotrímericas não se irão ligar e serão lavadas. Assim, o sinal remanescente será representativo das moléculas HT (aquelas que compreendem ambas BLYS e APRIL) na amostra. O padrão conhecido de molécula de HT 2 APRIL/um BLYS é utilizado para construir uma curva de concentração padrão e o sinal experimental obtido é comparado com esta curva padrão para produzir uma estimativa da concentração de HT na amostra biológica.

Também é descrito no presente documento um método para deteção dum nível de mARN HT numa amostra biológica derivada dum indivíduo, que compreende analisar uma amostra de polinucleótido dum indivíduo para o nível de mARN que codifica polipeptídeo de HT. O nível de mARN HT pode ser associado com doença autoimune.

Ainda noutras formas de realização, um método é proporcionada para detetar a presença e/ou um nível dum polipeptídeo de HT numa amostra biológica.

Estão disponíveis vários métodos para determinar o nível de expressão duma molécula de ácido nucleico HT, por exemplo, um mRNA HT ou polipeptídeo de HT numa amostra particular. O diagnóstico pode ser realizado por vários métodos para determinar a ausência ou a presença ou quantidades alteradas de ARNm HT normal ou anormal numa amostra do paciente. Por exemplo, a deteção pode utilizar a coloração de células ou secções histológicas com anticorpos marcados, realizada em conformidade com métodos convencionais. As células são permeabilizadas para corar as moléculas citoplasmáticas. Os anticorpos de interesse são adicionados à amostra de células e incubados por um período de tempo suficiente para permitir a ligação ao epítopo, normalmente pelo menos cerca de 10 minutos. O anticorpo pode ser marcado com radioisótopos, enzimas, fluorescência, quimioluminescência ou outros marcadores para deteção direta. Em alternativa, um anticorpo ou reagente de segunda etapa é utilizado para amplificar o sinal. Tais reagentes são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o anticorpo primário pode ser conjugado com biotina, com avidina conjugada com peroxidase de raiz-forte adicionada como um reagente de segunda etapa. Em alternativa, o anticorpo secundário conjugado com um composto fluorescente, por exemplo, fluoresceína, rodamina, Texas red, etc. A deteção final utiliza um substrato que sofre uma alteração de cor na presença da peroxidase. A ausência ou presença de ligação do anticorpo pode ser determinada por vários métodos, incluindo citometria de fluxo de células dissociadas, microscopia, radiografia, contagem de cintilação, etc. A presença e/ou o nível dum polipeptídeo de HT também pode ser detetado e/ou quantificado de qualquer maneira conhecida por um perito comum.

Adicionalmente, um teste pode incluir medições da expressão de ARNm HT. Estudos bioquímicos podem ser realizados para determinar se um polimorfismo na sequência

duma região que codifica ou região de controle de HT está associado com a doença. A doença associada a polimorfismos pode incluir deleção ou truncagem do gene, mutações que alteram o nível de expressão, que afetam a atividade da proteína, etc.

As alterações na sequência promotora ou potenciadora que podem afetar níveis de expressão de HT podem ser comparadas com os níveis de expressão do alelo normal por métodos vários conhecidos na técnica. Os métodos para determinar a força promotora ou potenciadora incluem quantificação da proteína natural expressa; inserção do elemento de controle variante num vetor com um gene repórter tal como β -galactosidase, luciferase, cloranfenicol-acetiltransferase, etc. que proporciona por quantificação conveniente e semelhante.

Os métodos de diagnóstico do tema da invenção (como definido nas reivindicações), em que o nível de HT é de interesse, envolvem a comparação da abundância de ácido nucleico ou proteína de HT duma amostra de interesse com a dum valor de controle para determinar quaisquer diferenças relativas, onde a diferença pode ser medida qualitativamente e/ou quantitativamente, culas diferenças são, então, relacionadas com a presença ou ausência de uns níveis de HT anormais. Uma variedade de diferentes métodos para determinar a abundância de ácido nucleico numa amostra são conhecidos dos peritos na especialidade, em que os métodos específicos de interesse incluem aqueles descritos em: Pietu et al., *Genome Res.* (junho 1996) 6: 492-503; Zhao et al., *Gene* (Apr. 24, 1995) 156: 207-213; Soares, *Curr. Opin. Biotechnol.* (outubro 1997) 8: 542-546; Raval, J. *Pharmacol Toxicol Methods* (novembro 1994) 32: 125-127; Chalifour et al., *Anal. Biochem* (1 de fevereiro de 1994) 216: 299-304; Stolz e Tuan, *Mol. Biotechnol.* (dezembro 1996) 6: 225-230; Hong et al., *Bioscience Reports* (1982) 2: 907 e McGraw, *Anal. Biochem.* (1984) 143:298. Também de

interesse são os métodos divulgados no documento WO 97/27317.

Por um gene cujo nível de expressão é "correlacionada com" ou "associada com" um estado fisiológico específico, pretende-se um gene cuja expressão mostra uma correlação estatisticamente significativa com o estado fisiológico. A força da correlação entre o nível de expressão de um gene expresso diferencialmente e a presença ou ausência de um estado fisiológico particular pode ser determinada por um teste de significância estatística. Os métodos para determinar a força de uma correlação entre o nível de expressão de um gene expresso diferencialmente e um estado fisiológico particular pela atribuição de uma pontuação estatística para a correlação são revistos em Holloway et al. (2002) Nature Genetics Suppl. 32:481-89, Churchill (2002) Nature Genetics Suppl. 32:490-95, Quackenbush (2002) Nature Genetics Suppl. 32:496-501; Slonim (2002) Nature Genetics Suppl. 32:502-08 e Chuaqui et al. (2002) Nature Genetics Suppl. 32:509-514. As pontuações estatísticas podem ser utilizadas para selecionar os genes cujos níveis de expressão têm a maior correlação com um estado fisiológico específico, a fim de aumentar a precisão do diagnóstico ou prognóstico dos métodos da invenção.

Testes adicionais que têm sido associados com a gravidade ou progressão da doença autoimune podem ser combinados com o teste de HT descrito acima para prestar um diagnóstico completo ou um resultado prospectivo.

Por exemplo, o American College of Rheumatology desenvolveu 11 critérios para diagnosticar LES, que abrangem o espectro clínico de LES em aspectos de testes de pele, sistêmico e laboratorial. Estes critérios incluem eritema malar, erupção cutânea discóide, sensibilidade à luz solar, úlceras orais, artrite, serosite, inflamação do sistema nervoso central e renal, alterações sanguíneas e a presença de anticorpos antinucleares. Um paciente deve

cumprir quatro destes critérios a fim de ser classificado como um paciente com LES. (Tan et al. (1982) *Arthritis Rheumatol.* 25:1271-1277). O LES é normalmente confirmado por testes que incluem, mas não estão limitados a, testes sanguíneos para detetar anticorpos anti-nucleares; testes de sangue e urina para avaliar a função renal; testes complementares para detetar a presença de níveis baixos de complemento que são frequentemente associados com LES; uma taxa de sedimentação (ESR) ou proteína C-reativa (PCR) para medir os níveis de inflamação; raios-X para avaliar danos nos pulmões e ECGs para avaliar os danos do coração.

Monitorização dos Efeitos do Tratamento com Fármaco

A monitorização da influência de agentes (por exemplo, fármacos, compostos) nos níveis de proteína HT (por exemplo, a modulação da ativação transcricional) pode ser aplicada não apenas no rastreio básico de fármaco, mas também em ensaios clínicos. Por exemplo, a eficácia dum determinado agente por um ensaio de rastreio para diminuir os níveis de proteína HT, como descrito no presente documento, pode ser monitorizada em ensaios clínicos de sujeitos que exibem expressão do gene HT ou níveis de proteína diminuídos. Em tais ensaios clínicos, a expressão ou a atividade de um gene HT e preferentemente, de outros genes que tenham sido implicados, por exemplo, um distúrbio associado com níveis de proteína HT, pode ser utilizada como uma "leitura" ou marcadores do fenótipo de uma célula particular, no caso presente, as células B.

Em algumas formas de realização, a presente especificação descreve um método para monitorizar a eficácia do tratamento dum sujeito com um agente (por exemplo, um agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, peptídeo, ácido nucleico, molécula pequena, ou outro fármaco) que compreende as etapas de (i) obter uma amostra de pré-administração dum indivíduo antes da administração do agente; (ii) detetar o nível de expressão

duma proteína HT ou mRNA na amostra de pré-administração; (iii) obter uma ou mais amostras pós-administração do sujeito, (iv) detetar o nível de expressão ou atividade da proteína HT ou mRNA nas amostras pós-administração; (v) comparar o nível de expressão ou atividade da proteína HT ou mRNA na amostra pré-administração com a proteína HT ou mRNA na amostra ou amostras pós-administração e (vi) alterar para o sujeito a administração do agente, em conformidade. De acordo com tal forma de realização, a expressão ou atividade de HT pode ser utilizada como um indicador da eficácia do agente, mesmo na ausência duma resposta fenotípica observável.

O nível de expressão basal de HT em diferentes tecidos pode ser determinado por análise de amostras de tecidos de indivíduos considerados para a presença ou ausência dum polimorfismo específico. Qualquer método conveniente pode ser utilizado, por exemplo, ELISA, RIA, etc. para a quantificação de proteínas, Northern blot ou outras análises de hibridização, RT-PCR quantitativo, etc. para a quantificação de mRNA. A expressão específica para tecido é correlacionada com o genótipo.

É determinada a alteração da expressão de HT em resposta a um modificador por administração ou combinação do modificador candidato com um sistema de expressão, por exemplo, animal, célula, ensaio de transcrição *in vitro*, etc. É determinado o efeito do modificador sobre a transcrição HT e/ou níveis de mRNA de estado estacionário. Como nos níveis de expressão basal, as interações específicas de tecido são de interesse. As correlações são feitas entre a capacidade dum modificador de expressão para afetar os níveis de HT e a presença dos polimorfismos proporcionados. Um painel de modificadores diferentes, tipos de células, etc pode ser rastreado a fim de determinar o efeito sob várias condições diferentes.

Métodos de Tratamento

A presente invenção proporciona um método de tratar um indivíduo diagnosticado clinicamente com uma condição associada com o aumento dos níveis séricos de HT. Os métodos compreendem geralmente analisar uma amostra biológica para medir os níveis de HT e comparar tais níveis àqueles presentes em controlos saudáveis. Um plano de tratamento que é mais eficaz para indivíduos diagnosticados clinicamente como tendo uma condição associada com o aumento dos níveis de HT, tal como doença autoimune, é então selecionado e o paciente é então tratado em conformidade. Assim, a invenção proporciona ainda um método para prever a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármaco para uma condição associada com níveis de HT aumentados, que compreende determinar uma expressão dum gene de HT do paciente, em que a presença de níveis de HT aumentados associada com uma condição autoimune, tal como LES e é preditivo da probabilidade do paciente responder a um tratamento com fármaco para a condição.

Assim, outro aspeto da invenção proporciona métodos para ajustar o tratamento terapêutico dum indivíduo com a expressão de HT de acordo com a resposta ao fármaco desse indivíduo. Os farmacogenómicos permitem a um clínico ou a um médico dirigir tratamentos profiláticos ou terapêuticos a pacientes que mais irão beneficiar do tratamento e evitar o tratamento de pacientes que irão experimentar efeitos secundários tóxicos relacionados com o fármaco.

Doenças autoimunes

A seguinte é uma lista não limitativa das doenças autoimunes possíveis cujo tratamento das mesmas pode ser ajudado pela utilização do ensaio de medição de HT divulgado presentemente. As doenças autoimunes reguladas por célula B incluem artrite (artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, artrite psoriática),

psoríase, dermatite incluindo dermatite atópica; urticária crônica autoimune, polimiosite/dermatomiosite, necrólise epidérmica tóxica, esclerodermia e esclerose sistêmica, respostas associadas com doença inflamatória dos intestinos (IBD) (doença de Crohn, colite ulcerosa), síndrome da angústia respiratória, síndrome de dificuldade respiratória no adulto (SDRA), meningite, rinite alérgica, encefalite, uveíte, colite, glomerulonefrite, condições alérgicas, eczema, asma, condições que envolvem infiltração de células T e respostas inflamatórias crônicas, aterosclerose, miocardite autoimune, deficiência de adesão de leucócitos, lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus (incluindo nefrite, não renal, discóide, alopecia), diabetes de início juvenil, esclerose múltipla, encefalomielite alérgica, respostas imunológicas associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citócinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose incluindo granulomatose de Wegener, agranulocitose, vasculite (incluindo ANCA), anemia aplástica, anemia positiva de Coombs, anemia Diamond-Blackfan, anemia hemolítica imune incluindo anemia hemolítica autoimune (AHAI), anemia perniciosa, aplasia pura dos glóbulos vermelhos (PRCA), deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças envolvendo diapedese de leucócitos, distúrbios inflamatórios do SNC, síndrome de lesão de múltiplos órgãos, miastenia gravis, doenças mediadas por complexos antígeno-anticorpo, doença da membrana basal antiglomerular, síndrome do anticorpo antifosfolípido, neurite alérgica, doença de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Miastenia de Lambert-Eaton, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, rejeição de transplante de órgãos sólidos (incluindo pré-tratamento painel para altos títulos de anticorpos reativos, depósito de IgA em tecidos, etc.), doença do enxerto versus

hospedeiro (GVHD), penfigóide bolhoso, pênfigo (todos, incluindo vulgaris, foliáceo), poliendocrinopatia autoimune, doença de Reiter, síndrome do homem rígido, arterite de células gigantes, nefrite do complexo imune, nefropatia IgA, polineuropatias IgM ou neuropatia mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), trombocitopenia autoimune, doença autoimune do testículo e do ovário incluindo orquite autoimune e ooforite, hipotireoidismo primário; doenças endócrinas autoimunes incluindo tiroidite autoimune, tiroidite crónica (tiroidite de Hashimoto), tiroidite subaguda, hipotireoidismo idiopático, doença de Addison, doença de Grave, síndromes poliglandulares autoimunes (ou síndromes de endocrinopatia poliglandular), diabetes do Tipo I também referido como diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM) e síndrome de Sheehan; hepatite autoimune, pneumonite intersticial linfóide (HIV), bronquiolite obliterante (não transplante) vs NSIP/PINE, síndrome de Guillain-Barre, vasculite de vasos grandes (incluindo polimialgia reumática e de Arterite células gigantes (de Takayasu)), vasculite de vasos médios (incluindo doença de Kawasaki e poliartrite nodosa), espondilite anquilosante, doença de Berger (nefropatia por IgA), glomerulonefrite rapidamente progressiva, cirrose biliar primária, doença celíaca (enteropatia ao glúten), Crioglobulinemia, ELA e doença arterial coronariana.

Antagonistas BLYS e/ou APRIL

Se são vistos altos níveis de HT num paciente que sofre duma doença autoimune, isto sugere a probabilidade de que o paciente irá responder favoravelmente à inibição BLYS e/ou APRIL. Assim, a presente especificação descreve antagonistas BLYS e/ou APRIL que são utilizados para o tratamento de doenças autoimunes em que o paciente tem níveis elevados de HT. Os exemplos seguintes são representativos de antagonistas BLYS e/ou APRIL que podem

ser utilizados para tratar tais pacientes. Para o propósito de funcionar como um antagonista BLYS e/ou APRIL, o domínio extracelular de qualquer recetor da família do TNFR é um polipeptídeo essencialmente livre de domínios de transmembrana ou citoplásmicos que geralmente mantêm a capacidade de se ligarem a BLYS. Especificamente, o domínio extracelular de TACI pode compreender aminoácidos 1 a 154 da sequência de polipeptídeo TACI (SEQ ID NO: 2). Além disso, o ECD pode ser fragmentos ou variantes desta sequência, tais como formas de ECD de TACI como descrito em von Bulow *et al.*, supra, documento WO 98/39361, documento WO 00/40716, documento WO 01/85782, documento WO 01/87979, e documento WO 01/81417. Em particular, estas formas de ECD podem compreender aminoácidos 1-106 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-142 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 30-154 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 30-106 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 30-110 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 30-119 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-166 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-165 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-114 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-119 da SEQ ID NO:2, aminoácidos 1-120 da SEQ ID NO:2 e aminoácidos 1-126 da SEQ ID NO:2. Adicionalmente, o ECD de TACI pode compreender aquelas moléculas que têm apenas um domínio rico em cisteína.

As formas de ECD de BAFF-R incluem aquelas que compreendem os aminoácidos 1-71 da sequência de polipeptídeo de BAFF-R (SEQ ID NO:4). Adicionalmente, o ECD pode ser fragmentos ou variantes desta sequência, tais como formas de ECD de BAFF-R como descrito em documento WO 02/24909, documento WO 03/14294 e documento WO 02/38766. Em particular, estas formas de ECD podem compreender aminoácidos 1-77 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 7-77 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 1-69 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 7-69 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 2-62 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 2-71 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 1-61 da SEQ ID NO:4 e aminoácidos 2-63 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 1-45 da SEQ ID

NO:4, aminoácidos 1-39 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 7-39 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 1-17 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 39-64 da SEQ ID NO:4, aminoácidos 19-35 da SEQ ID NO:4 e aminoácidos 17-42 da SEQ ID NO:4. Adicionalmente, o ECD de BAFF-R pode compreender aquelas moléculas que têm um domínio rico em cisteína.

As formas de ECD de BCMA incluem aquelas que compreendem os aminoácidos 1-48 da sequência de polipeptídeo de BCMA (SEQ ID NO:6). Adicionalmente, o ECD pode ser fragmentos ou variantes desta sequência, tais como formas de ECD de BCMA como descrito em documento WO 00/40716 e documento WO 05/075511. Em particular, estas formas de ECD podem compreender aminoácidos 1-150 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 1-48 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 1-41 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 8-41 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 8-37 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 8-88 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 41-88 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 1-54 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 4-55 da SEQ ID NO:6, aminoácidos 4-51 da SEQ ID NO:6 e aminoácidos 21-53 da SEQ ID NO:6. Adicionalmente, o ECD de BCMA pode compreender aquelas moléculas que têm apenas um domínio rico em cisteína parcial.

Numa forma adicional de realização, a região de ligação BLYS dum recetor BLYS (por exemplo, um domínio extracelular ou fragmento do mesmo de BAFF-R, BCMA ou TACI) pode ser fundido a uma de Fc numa molécula de imunoglobulina para facilitar a sua solubilidade *in vivo*. De acordo com uma forma de realização, o antagonista BLYS e/ou APRIL liga-se a um polipeptídeo BLYS com uma afinidade de ligação de 100nM ou menos. De acordo com uma outra forma de realização, o antagonista BLYS e/ou APRIL liga-se a um polipeptídeo BLYS com uma afinidade de ligação de 10nM ou menos. o antagonista BLYS e/ou APRIL liga-se a um polipeptídeo BLYS com uma afinidade de ligação de 1nM ou menos.

Noutro exemplo, antagonistas BLyS e/ou APRIL incluem polipeptídeos que ligam BLyS que não são sequências nativas ou variantes da mesma. Alguns exemplos de tais polipeptídeos são aqueles que têm a sequência de Formula I, Formula II, Formula III como descrito em documento WO 05/000351. Em particular, alguns polipeptídeos de ligação incluem ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO:13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:14), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO:15), ECFDLLVRSWVPCMLR (SEQ ID NO:16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:17) ou as sequências listadas na FIGURA 32 do documento WO 05/000351.

Em alternativa, o antagonista BLyS e/ou APRIL pode ligar-se a um domínio extracelular TACI de sequência nativa, BAFF-R ou BCMA na sua região de ligação BLyS para bloquear parcialmente ou completamente, inibir ou neutralizar a ligação BLyS *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*. Por exemplo, tal antagonista indireto é um anticorpo TACI que se liga numa região de TACI tal que a ligação BLyS é impedida estericamente. Por exemplo, a ligação em aminoácidos 72-109 ou numa região vizinha acredita-se que bloqueia a ligação BLyS. Pode também ser vantajoso bloquear a ligação de APRIL a esta molécula, o que se acredita que ocorra na região de aminoácidos 82-222. Outro antagonista BLyS e/ou APRIL é um anticorpo de BAFF-R que se liga numa região de BAFF-R tal que a ligação de BAFF-R humano a BLyS é impedido estericamente. Por exemplo, a ligação em aminoácidos 23-38 ou aminoácidos 17-42 ou numa região vizinha acredita-se que bloqueia a ligação BLyS. Finalmente, um antagonista mais indireto seria um anticorpo APRIL que se liga numa região de APRIL tal que a ligação BLyS é impedida estericamente. Por exemplo, a ligação em aminoácidos 5-43 ou numa região vizinha acredita-se que bloqueia a ligação BLyS (ou APRIL).

Em algumas formas de realização, um antagonista BLyS e/ou APRIL inclui anticorpos BLyS. O termo "anticorpo"

quando referido é utilizado no seu sentido mais amplo e cobre especificamente, por exemplo, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos com especificidade de poliepítomos, anticorpos de cadeia única e fragmentos de anticorpos. De acordo com algumas formas de realização, um polipeptídeo desta invenção é fundido numa estrutura de anticorpo, por exemplo, na região variável ou numa CDR de tal modo que o anticorpo se pode ligar a e inibir a ligação BLYS a TACI, BAFF-R ou BCMA ou inibir a sinalização BLYS. Os anticorpos que compreendem um polipeptídeo podem ser quimérico, humanizado, ou humano. Os anticorpos que compreendem um polipeptídeo podem ser um fragmento de anticorpo.

Em alternativa, um anticorpo pode ser produzido por imunização dum animal com um polipeptídeo. Assim, é contemplado um anticorpo dirigido contra um polipeptídeo descrito.

Em particular, são contemplados anticorpos específicos para BLYS que se ligam dentro duma região BLYS humanos (SEQ ID NO:8) que compreende resíduos 162-275 e/ou um aminoácido vizinho de aminoácidos selecionado a partir do grupo que consiste em 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 e 265 BLYS humanos. A ligação dos anticorpos são tais que o anticorpo impede estericamente a ligação BLYS a um ou mais dos seus recetores. Tais anticorpos são descritos no documento WO 02/02641 e documento WO 03/055979. Um anticorpo particularmente preferencial é o descrito como Lymphostat-B (Baker et al. (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253-3265).

Outros fármacos imunossupressores

A especificação descreve a utilização doutros fármacos imunossupressores quer isoladamente ou em combinação com um inibidor BLYS e/ou APRIL. Estes outros fármacos incluem, mas não estão limitados a, agentes imunossupressores tais como inibidores da calcineurina (por exemplo, ciclosporina A ou FK506), esteróides (por exemplo, prednisona metilo ou

prednisona) ou agentes imunossupressores que param o crescimento de células imunitárias (por exemplo, rapamicina), inibidores via anti-CD40 (por exemplo, anticorpos anti-CD40, anticorpos ligando anti-CD40 e inibidores de moléculas pequenas da via CD40), inibidores da via de salvamento de transplante (por exemplo, o micofenolato de mofetil (MMF)), antagonistas do recetor IL-2 (por exemplo, Zeonpax.COPYRIGHT. de Hoffmann-la Roche Inc. e Simulet da Novartis, Inc.) ou análogos dos mesmos, ciclofosfamida, talidomida, azatioprina, anticorpos monoclonais (por exemplo, Daclizumab (anti-interleucina (IL)-2), Infliximab (fator de necrose anti-tumoral), MEDI-205 (anti-CD2), abx-cbl (anti-CD147)) e anticorpos policlonais (por exemplo, ATG (globulina antitimócito)).

Formulações Farmacêuticas

As formulações terapêuticas dos antagonistas BLYS e/ou APRIL tais como anticorpos que ligam BLYS utilizados como descrito no presente documento são preparados para armazenamento misturando um anticorpo que tem o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizadores opcionais aceitáveis farmaceuticamente, (Remitgtorz's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas.

Veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são recetores não tóxicos nas dosagens e concentrações empregues e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tal como cloreto de octadecildimetilbenzil amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, butilo ou álcool benzílico; parabenos de alquil tais como parabeno de metil ou propil; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); baixa massa molecular (menos de que cerca de 10 resíduos);

polipeptídeos; proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíções formadores de sal tal como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensioativos não iônicos tais como TWEEN, PLURONICS[™] ou polietilenoglicol (PEG)).

A formulação no presente documento também pode conter mais dum composto ativo se necessário, para a indicação particular a ser tratada, preferentemente aqueles com atividades complementares que não se afetem adversamente uns aos outros. Por exemplo, pode ser desejável proporcionar adicionalmente um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico, citoquina ou um agente imunossupressor (por exemplo, um que atua em células T, tal como ciclosporina ou um anticorpo que se liga a células T, por exemplo, um que se liga a LFA-1). A quantidade eficaz de tais outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, do tipo de doença ou distúrbio ou tratamento e doutros fatores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas dosagens e com vias de administração como descrito no presente documento ou cerca de 1 a 99% das dosagens empregues até agora.

Os ingredientes ativos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilceluloso ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli (metacrilato de metil), respetivamente, em sistemas de entrega de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em

macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos que contêm o antagonista, matrizes estas que estão na forma de artigos enformados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), e poli álcool vinílico)), polilactídeos (Patente U.S. N.º 3 773 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etil, etileno-acetato de vinilo não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tais como o LUPRON DEPOT (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

As formulações a ser utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

EXPERIMENTAÇÃO

Os exemplos seguintes são impulsioneiros do propósito de proporcionar aos peritos na especialidade uma divulgação e descrição completas de como produzir e utilizar a presente invenção e não pretendem limitar o âmbito daquilo que os inventores consideram como a sua invenção, nem pretendem representar que as experiências abaixo são todas ou as únicas experiências realizadas. Têm sido feitos esforços para assegurar a precisão em relação aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.) mas alguns erros experimentais e desvios devem ser considerados. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, massa molecular é massa média da massa molecular, temperatura é em graus Celsius e pressão é ou está próxima da atmosférica.

EXEMPLO 1: ENSAIO PARA MEDIR NÍVEIS DE HT

Reagentes: anticorpo Anti-APRIL conjugado a conta (exemplo, E9617 anticorpo anti-APRIL ZGEN (clone 319.6.8.5) conjugado com BioRad xMap conta 106 (Hercules, CA)) anticorpo Anti-APRIL biotinilado (E4731 anticorpo anti-BLyS ZGEN (clone 258.2.1.9.1.3) biotinilado) estreptavidina-PE (Jackson ImmunoResearch. Labs, Inc (West Grove, PA) #016-110- 084) placas Multiscreen (Millipore (Billerica, MA), MABVN1250) ELISA B (ELISA C + 1% BSA + NaAZ) heterotrimero de APRIL/BLyS LOTE A1642F padrão (25 ng/mL), QC1 (7,5ng/mL) e QC2 (500pg/mL) (2 subunidades de APRIL, um BLyS) Soro AB de Amostras Humanas (pré-rastreados para conteúdo baixo de BLyS e APRIL) Shaker

- 1) Trazer todos os reagentes à temperatura ambiente
- 2) Bloquear placa: adicionar 100uL de ELISA B a todos os poços, agitar durante 10', vácuo.
- 3) Submeter a vórtice as contas durante 30", sonicar as contas durante 30"
 - a. Determinar volume das contas a adicionar: 5K contas/poço em 25 uL/poço ELISA B
 - b. Para uma placa completa 2,5 mL + 5E5 contas
- 4) Adicionar 25uL de mistura de contas por poço a todos os poços.
- 5) Diluir padrões: padrão diluído de A1642F (25 ng/mL) em ELISA B, 1:3 seis vezes para uma série de diluição de 7 pontos: 25000, 8333, 2778, 926, 309, 103 e 34 pg/mL.
- 6) Adicionar 25 uL 25000 pg/mL padrão a A1, 8333 pg/mL padrão a B1, etc.
- 7) Adicionar 25 uL de QC1 a A2, adicionar 25 uL de QC2 a B2.
- 8) Adicionar 25 uL de soro a todos os poços padrão, fundo e QC.
- 9) Adicionar 25 uL ELISA B a todos os poços da amostra e ao poço de fundo.
- 10) Adicionar 25 uL de amostra de soro a cada poço da

amostra *, **.

11) Vedar a placa e cobrir com película metalizada. Colocar no agitador a 600 RPM durante 60' a Ta.

12) Vácuo. Lavar placa com 2x100 uL de ELISA B.

13) Adicionar 25 uL/poço de 1 ug/mL de anticorpo E4731-biotina.

14) Vedar a placa e cobrir com película metalizada. Colocar no agitador a 600 RPM durante 60'

15) Sem lavar ou aspirar adicionar 25 uL/poço 1:100 SA-PE em ELISA B.

16) Vedar a placa e cobrir com película metalizada. Colocar no sacudidor a 600 RPM durante 30'

17) Vácuo. Lavar placa com 2x100 uL de ELISA B.

18) Adicionar 110 uL de ELISA B por poço. Misturar a 600 RPM durante 5'

19) Executar em Luminex 100.

Mapa de Placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2500	QC1	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
B	8333	QC2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
C	2778		1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
D	926		1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
E	309	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	S21
F	103	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
G	34	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
H	B	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16

É muito importante executar amostras puras e nas diluições seguintes: 1:4, 1:8 e 1:16. Isto é necessário para permitir que os complexos de HT nativos se dissociem e este não é um efeito de soro. A concentração do soro deve ser mantida constante ao longo das séries de diluição pela diluição de amostras com o soro padrão. Ter menos de 25 uL de soro em cada poço pode fazer com que esses poços exibam valores errados.

- Exemplo de desempenho do ensaio:

	Heterotrímero pg/mL		Estatísticos	
	Esperado	Observado	%VC	Erro Relativo
Padrões	25000	27062	2,0%	-8,2%
	8333	8039	0,4%	3,5%
	2778	2931	3,0%	-5,5%
	926	874	3,6%	5,6%
	309	316	1,4%	-2,5%
	103	110	13,0%	-7,2%
	34	32	13,9%	7,3%
QC1	7500	7259	12,3%	3,2%
QC2	500	455	5,5%	8,9%

Os valores aceitáveis para os controlos padrão e de qualidade são +/-25% dos valores esperados. O LOD ensaio é esperado ser 100pg/mL com amostras executadas puras (100% soro). O ensaio pode ser executado com precisão até 34pg/mL.

O padrão utilizado neste ensaio é um HT que contém 2 subunidades APRIL e 1 subunidade BlyS. Os valores absolutos de HT nativo serão diferentes se esta molécula é relativamente rara no soro do paciente, no entanto, neste momento não há evidência de que haja qualquer viés para qualquer combinação trimérica particular.

EXEMPLO 2: MEDIÇÃO DE HT EM SOROS DE PACIENTE E CONTROLO SAUDÁVEL

O domínio de trimerização N-terminal ZymoZipper permite a produção de heterotrímeros BlyS/APRIL recombinantes (rHT), que foram utilizados como um padrão para desenvolver um imunoensaio baseado em conta para quantificar HT nativo em soro humano como descrito no Exemplo 1. Neste ensaio, juntamente com ELISAs específicas de BlyS e APRIL foram utilizados para medir estes 3 ligandos em soros de controlos saudáveis (CS; n=79) e pacientes de lúpus eritematoso sistémico (LES; n=30) e

artrite reumatoide (AR; n=29) (ver Figuras 1 e 2). A atividade biológica de rHT foi comparada com a de rBLyS e rAPRIL, num ensaio de sinalização de 4 horas utilizando células Jurkat transfetadas de TACI com um gene repórter NFkB/luciferase e num ensaio de proliferação de célula B humana primária de 4 dias.

Significativamente mais pacientes com LES que CS tinham HT detetável no soro (70% vs. 14%, $p < 0,0001$, teste exato de Fisher) e 24% de pacientes com AR tinham HT detetável. Nesta coorte, a média dos níveis séricos de HT foram 177 pg/mL (LES), 64 pg/mL (AR) e 66 pg/mL (CS). No ensaio de Jurkat-TACI (ver Exemplo 4), a sinalização rHT é semelhante ao de BLyS ou APRIL. No ensaio de célula B (ver Exemplo 3), rHT são indutores menos potentes que os ligantes homotrimérico (valores EC50: 0,02 nM para BLyS, 0,17 nM para APRIL e 4,06 nM para HT). Isto provavelmente reflete a expressão predominante de BAFF-R, ao qual a nossa rHT se liga fracamente, em células B em circulação. Atacicept e BCMA-Ig neutralizam a atividade de todos os 3 ligandos nestes ensaios, enquanto BAFFR-Ig exibe pouca ou nenhuma inibição da atividade de rHT. Os nossos dados confirmam que HT nativo são elevados em pacientes autoimunes e demonstram que rHT são ativos biologicamente. Se HT nativo tem um papel biológico distinto dos seus homólogos homotriméricos permanece para ser determinado. Atacicept inibe a bioatividade de todas as 3 formas de ligandos, o que pode revelar-se importante no tratamento clínico da doença autoimune.

Num segundo conjunto de pacientes com LES, que incluíam 72 pacientes com LES e 42 controlos saudáveis. Os níveis de BLyS e APRIL foram determinados por ELISA. Os níveis de HT foram medidos em 36 pacientes e 25 controlos utilizando um ensaio baseado em luminex. HT foi detetado em mais pacientes que em controlos (72% vs. 32% $\chi^2 = 0,0019$).

EXEMPLO 3: ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULA B

Um frasco para injetáveis que contém 1×10^8 congelado, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de aférese foi rapidamente descongelado em 37°C banho de água e ressuspensas em 25 ml de meio de células B (Meio 1640 de RPMI, 10% de soro de bovino fetal inativado a alta temperatura, 5% de L-glutamina, 5% de Pen/Strep) num tubo de 50 ml. As células foram testadas para viabilidade de utilização de azul de tripano (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). As células CD19+B foram então isoladas por seleção positiva utilizando microesferas revestidos anti-CD19 (Miltenyi Biotech). As células revestidas foram, em seguida, isoladas numa coluna MACS LS (Miltenyi Biotech) As células B foram ressuspensas a uma concentração final de $1,6 \times 10^6$ células/ml em meio de células B e plaqueadas a 100 µl/poço, numa placa de 96 poços fundo U (Falcon, VWR, Seattle, WA). HT e ligandos homotriméricos foram preparados e foram adicionados às células em 3 diluições dobradas de 1000 ng/ml a 0 ng/ml. O volume final foi de 200 µl/poço.

As células foram então incubadas a 37°C num incubador humidificadodurante 72 horas. Dezasseis horas antes da colheita, 1 µCi de 3H timidina foi adicionado a todos os poços. As células foram recolhidas numa placa de filtro de 96 poços (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT) em que foram recolhidas utilizando um recolhedor de células (Packard) e coletadas de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram secas a 55 °C durante 20-30 minutos e o fundo dos poços foi selado com um selante de placa opaco. Para cada poço foi adicionado 0,25 ml de fluido de cintilação (Microscint-O, Packard) e a placa foi lida utilizando um TopCount Microplate Scintillation Counter (Packard)

EXEMPLO 4: BIOENSAIO DE CÉLULAS JURKAT TRANFETADAS POR TACI

O bioensaio *in vitro* TACI utiliza uma linha celular Jurkat (linfócito células T aguda humana, KZ142, clone #24)

que foi transfetado com dois plasmídeos. Primeiro, a linha celular foi transfetada com um plasmídeo contendo um gene repórter de luciferase sob o controle do promotor NF- κ B/AP-1 e um gene resistente a neomicina. Um clone apropriado foi escolhido após seleção com G418. Esta linha celular foi então transfetada com um plasmídeo contendo o ADNc de TACI de comprimento completo sob o controle do promotor CMV (TACI/pZP7P) e um gene resistente a puromicina. Os clones foram selecionados com puromicina e, em seguida, uma linha celular apropriada escolhida para o ensaio por avaliação para a expressão de TACI por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais de TACI.

O ensaio baseia-se na gravação da leitura da expressão do gene de luciferase que é desencadeada pela ligação do ligando de teste (HT ou BLyS homotrimérico ou APRIL homotrimérico) a TACI de superfície celular produzido por a partir do ADNc de TACI.

As células Jurkat transfetadas foram propagadas em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Rosewell Park Memorial Institute, Buffalo, Nova Iorque) adicionado com 10% FBS. Foi adicionada puromicina a 2 μ g/ml como um reagente seletivo para a transfeção. Também foram adicionados ao meio piruvato de sódio e L-glutamina a volume de 1% de volume. O substrato e tampão de ensaio de Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI #E2510) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio foi realizado por ressuspensão de células Jurkat transfetadas em meio de $1,6 \times 10^6$ célula/ml. As células são plaqueadas numa placa de ensaio branca com 50 μ l por poço. Amostras de ZZ-APRIL foram trazidas para diluição adequada e colocadas numa placa de 96 poços. As diluições foram adicionadas às células, a 50 μ l por poço. A placa foi incluída 4 horas numa incubadora de 37 °. Durante a incubação, o tampão e o substrato de Steady-GLO foi

equilibrado à temperatura ambiente. Após as 4 horas de incubação, a placa foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente durante 5 minutos. O tampão e o substrato de ensaio foram misturados em conjunto e adicionados a 100 µl por poço. As placas foram turbilhoadas a baixa configuração durante 1 minuto para misturar, em seguida, incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. A placa foi então lida num luminómetro com integração de cinco segundos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Stacey R. Dillon Brandon J. Harder

<120> NÍVEIS SÉRICOS DE HETEROTRÍMEROS BLYS/APRIL E
UTILIZAÇÃO EM MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

<130> 054878/371388

<160> 26

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 1377

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

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

<400> 1

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg	49
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg	
1 5 10	
agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg	97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly	
15 20 25	
gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg	145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu	
30 35 40	
ggc acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc	193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg	
45 50 55 60	
acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc	241
Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly	
65 70 75	
aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc	289
Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile	
80 85 90	
tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc	337
Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu	
95 100 105	
agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga	385
Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly	
110 115 120	
gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag	433
Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu	
125 130 135 140	

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagagggtgg ggagagggga 972
gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga 1032
gaggagagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga 1092
ggcagagaag gaagagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga 1152
gggagagagg cagagagaca gagagggaga gagggacaga gagagataga gcaggaggtc 1212
ggggcactct gagtccagc tcccagtgca gctgtaggtc gtcattacct aaccacacgt 1272
gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gccccgaga gcccctcctc ctggagaata 1332
aaaccttttg cagctgcctt tcctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1377

```

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>2

```

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

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

```

<210> 3

<211> 586

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (27)...(578)

<400>3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tagcaggg 586

```

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

<400> 4

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

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
180

```
<210> 5
<211> 995
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (219)...(770)
```

<400>5

```

aagactcaaa cttagaaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgcgcgagaag 60
acacagacag ccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttcacaggc 180
tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgata atg ttg cag atg got ggg 236
                                     Met Leu Gln Met Ala Gly
                                     1           5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

gct agg taattaacca tttagactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag 820
Ala Arg

aatagatgat gtgtcagata tctttaggat gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt 880
tttgtctctt aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg 940
agcttaatgg tagaaacttc cttgggttca tgattaaagt cttttttttt cotga 995

```

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

<400> 6

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

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

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

<400> 7

EP2291657B1

```
gaattcggea cgaggcagaa aggagaaaat tcaggataac tctcctgagg ggtgagccaa 60
gcctgccat gtagtgcacg caggacatca acaaacacag ataacaggaa atgattcatt 120
ccctgtggtc acttattota aaggccccaa cttcaaagt tcaagtagtg at atg gat 178
Met Asp
```

1

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

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

EP2291657B1

```

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

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

tgtctgtagc tattttcctc cctttctctg tacctctaag aagaaagaat ctaactgaaa 1103
ataccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctcgagcgc gcgcgc 1149
```

<210> 8

<211> 283

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>8

```

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

```

<210> 9

<211> 185

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>9

```

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

```

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipeptídeo que liga BLYS

<400> 11

EP2291657B1

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

Lys

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipeptídeo que liga BLYS

<400> 12

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

Lys

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipeptídeo que liga BLYS

<400> 13

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

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipeptídeo que liga BLyS

<400> 14

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

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polipeptídeo que liga BLyS

<400> 15

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

<210> 16

<211> 1214

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<220>

<221> CDS

<222> (17)...(1192)

<400> 16

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

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc	388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu	
110 115 120	
agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga	436
Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly	
125 130 135 140	
agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc	484
Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu	
145 150 155	
cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca	532
Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
160 165 170	
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc	580
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe	
175 180 185	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	628
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
190 195 200	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	676
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
205 210 215 220	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	724
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
225 230 235	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	772
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
240 245 250	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	820
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
255 260 265	
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	868
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
270 275 280	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	916
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
285 290 295 300	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	964
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
305 310 315	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1012
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
320 325 330	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1060
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
335 340 345	

EP2291657B1

```

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

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

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

gcgcgccaat ta 1214
```

<210> 17

<211> 392

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<400> 17

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

<210> 18

<211> 1070

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<220>

<221> CDS

<222> (17)...(1048)

<400> 18

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

125	130	135	140	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc				484
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	145	150	155	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc				532
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	160	165	170	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg				580
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	175	180	185	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc				628
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	190	195	200	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc				676
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	205	210	215	220
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc				724
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	225	230	235	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg				772
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	240	245	250	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc				820
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	255	260	265	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg				868
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	270	275	280	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc				916
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	285	290	295	300
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag				964
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	305	310	315	
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac				1012
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	320	325	330	
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag				1058
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	335	340		
gcgcgcgaat ta				1070

<210> 19

<211> 344

EP2291657B1

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<400> 19

[illegible]

```
<210> 20
<211> 1082
<212> ADN
<213> Sequência artificial
```

EP2291657B1

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<220>

<221> CDS

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

<400> 20

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg	52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu	
1 5 10	
ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc	100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala	
15 20 25	
gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag	148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln	
30 35 40	
tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc	196
Tyr Trp Asp Pro Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys	
45 50 55 60	
aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc	244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser	
65 70 75	
tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc	292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys	
80 85 90	
atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac	340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr	
95 100 105	
ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act	388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr	
110 115 120	
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca	436
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser	
125 130 135 140	
gtc ttc ctc ttc ccc cca asa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg	484
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
145 150 155	
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct	532
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
160 165 170	
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc	580
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
175 180 185	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc	628
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
190 195 200	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac	676
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
205 210 215 220	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc	724
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	
225 230 235	

```

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

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

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

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

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

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

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

taatctagag ggcggccaat ta 1082

```

<210>21

<211> 348

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<400> 21

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

<210> 22

<211> 1109

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<220>

<221> CDS

<222> (17)...(1090)

<400> 22

```

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

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

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

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

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

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

```

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

EP2291657B1

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

```
aag agc ctc tcc ctg tct cgg ggt aaa taa totagaggcg cgccaatta 1109
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
      350                      355
```

<210> 23

<211> 357

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão TACI-Fc

<400> 23

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

<210>	24
<211>	311
<212>	PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão BAFF-R-Fc

<400> 24

```

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

```

EP2291657B1

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

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

<400> 25

```

ggtaacgagggc ttccctagagg gactggaacc taattctcct gaggetgagg gaggggtggag 60
ggtctcaagg caacgctggc cccacgaagg agtgccagga gcactaacag tacccttagc 120
ttgctttcct cctccctcct ttttatcttc aagttccttt ttatttctcc ttgcgtaaca 180
acctttctcc cttctgcacc actgcccgtc cccttaccgg ccccgccacc tccttgetac 240
cccactcttg aaaccacagg tgttggcagg gtccccagct c atg cca gcc tca tct 296
Met Pro Ala Ser Ser
1 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

EP2291657B1

```

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

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

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

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

aagaccaggg tgggtacata ctggagacag ccaagagctg agtatataaa ggagagggaa 1124
tgtgcaggaa cagaggcacc ttcttgggtt tggctccccg ttctcactt ttcccttttc 1184
attcccaccc cctagacttt gattttacgg atatcttgc tctgttcccc atggagctcc 1244
gaattctttgc gtgtgtgtag atgaggggag ggggacgggc gccaggcatt gttcagacct 1304
ggtcggggcc cactggaagc atccagaaca gcaccaccat ctta 1348

```

<210> 26

<211> 250

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9839361 A [0001] [0112]
- WO 0202641 A [0002] [0119]
- US 20060034852 A [0002]
- WO 050000351 A [0002]
- WO 03035846 A [0002]
- WO 0216312 A [0002]
- US 4816567 A [0038] [0039]
- US 5500362 A [0045]
- US 5821337 A [0045]
- US 530672 A [0066]
- US 5654173 A [0068]
- EP 0036776 A [0072]
- US 4551433 A [0072]
- US 4837148 A [0072]
- US 4929555 A [0072]
- EP 0244234 A [0072]
- WO 9100357 A [0072]
- US 4745051 A [0072]
- EP 0127839 A [0072]
- EP 0155476 A [0072]
- US 4399216 A [0073]
- US 4767704 A [0073]
- US 4657866 A [0073]
- US 4927762 A [0073]
- US 4560655 A [0073]
- WO 90103430 A [0073]

- WO 8700195 A [0073]
- US RE30985 E [0073]
- US 5641670 A [0075]
- US 5733761 A [0075]
- WO 9915650 A [0075]
- WO 9308829 A [0085]
- WO 9404690 A [0087]
- US 5731168 A [0087]
- US 4676980 A [0088]
- WO 9100360 A [0088]
- WO 92200373 A [0088]
- EP 03089 A [0088]
- WO 9727317 A [0101]
- WO 0040716 A [0112] [0114]
- WO 0185782 A [0112]
- WO 0187979 A [0112]
- WO 0181417 A [0112]
- WO 0224909 A [0113]
- WO 0314294 A [0113]
- WO 0238766 A [0113]
- WO 05075511 A [0114]
- WO 05000351 A [0116]
- WO 03055979 A [0119]
- US 3773919 A [0124]

Documentos de não patente citados na descrição

- **SMITH et al.** The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins. *Activation, Costimulation and Death*, 1994, vol. 76, 959-62 [0001]
- **COSMAN.** *Stem Cells*, 1994, vol. 12, 440-55 [0001]
- **GRAS et al.** *Int. Immunol.*, 1995, vol. 17, 1093-106 [0001]
- **HATZOGLU et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, 1322-30 [0001]
- **VON BÜLOW ; BRAM.** *Science*, 1997, vol. 228, 138-41

[0001]

- THOMPSON et al. *Science*, 2001, vol. 293, 2108-11 [0001]
- SHU et al. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, vol. 65, 680-683 [0001]
- HAHNE et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185-1190 [0001]
- DILLON et al. *Nat. Rev. Drug Dis.*, 2006, vol. 5, 235-246 [0002]
- BAKER et al. *Arthritis Rheum*, 2003, vol. 48, 3253-3265 [0002] [0119]
- ROSCHKE et al. *J. Immunol.*, 2002, vol. 169, 4314-4321 [0003]
- ROSCHKE V et al. *J. Immunology*, 01 January 2002, vol. 169, 4314-4321 [0004]
- MALIN V JONSSON et al. *J. Clin. Immunology*, 01 May 2005, vol. 25 (3), 189-201 [0004]
- DARIDON et al. *Autoimmunity Reviews*, 01 February 2008, vol. 7 (4), 267-271 [0004]
- SEYLER THORSTEN M et al. *J. Clin. Investigation*, November 2005, vol. 115 (11), 3083-3092 [0004]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0034]
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0038]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0038]
- MARKS et al. *J. Mol.Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0038]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0039]
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0041]
- REICHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0041]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2 [0041]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol.Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0042]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0042]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*.

- Alan R. Liss, 1985, 77 [0042]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0042]
 - RAVETCH ; KINET. *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0045]
 - CLYNES et al. *PNAS*, 1998, vol. 95, 652-656 [0045]
 - GAZZANO- SANTORO ETAL. *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0046]
 - Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0049]
 - HAHNE et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185-90 [0058]
 - MOORE et al. *Science*, 1999, vol. 285, 260-3 [0059]
 - STEMMER et al. *Gene*, 1995, vol. 164 (1), 49-53 [0065]
 - STEMMER. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-391 [0065]
 - SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0065]
 - CHANG et al. *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0072]
 - GOEDDEL et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0072]
 - GOEDDEL et al. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0072]
 - DEBOER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1983, vol. 80, 21-25 [0072]
 - SIEBENLIST et al. *Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0072]
 - HINNEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, vol. 75, 1929 [0072]
 - ITO et al. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 153, 163 [0072]
 - KURTZ et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 142 [0072]
 - KUNZE et al. *J. Basic Microbiol.*, 1985, vol. 25, 141 [0072]
 - GLEESON et al. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459 [0072]
 - ROGGENKAMP et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, vol. 202, 302 [0072]
 - DAS et al. *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 158, 1165 [0072]

- DE LOUVENCOURT et al. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 737 [0072]
- VAN DEN BERG et al. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0072]
- CREGG et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3376 [0072]
- BEACH ; NURSE. *Nature*, 1981, vol. 300, 706 [0072]
- DAVIDOW et al. *Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 380 [0072]
- GAILLARDIN et al. *Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 49 [0072]
- BALLANCE et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0072]
- TILBURN et al. *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0072]
- YELTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0072]
- KELLY; HYNES. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475479 [0072]
- The Regulation of Baculovirus Gene Expression. FRIESEN et al. *The Molecular Biology Of Baculoviruses*. 1986 [0072]
- VLAK et al. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 765-776 [0072]
- MILLER et al. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, vol. 42, 177 [0072]
- CARBONELL et al. *Gene*, 1988, vol. 73, 409 [0072]
- MAEDA et al. *Nature*, 1985, vol. 315, 592-594 [0072]
- LEBACQ-VERHEYDEN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 3129 [0072]
- SMITH et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 8844 [0072]
- MIYAJIMA et al. *Gene*, 1987, vol. 58, 273 [0072]
- MARTIN et al. *DNA*, 1988, vol. 7, 99 [0072]
- LUCKOW et al. *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47-55 [0072]
- MILLER et al. *Generic Engineering*, 1986, vol. 8, 277-279 [0072]

- DIJKEMA et al. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 761 [0073]
- GORMAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, vol. 79, 6777 [0073]
- BOSHART et al. *Cell*, 1985, vol. 41, 521 [0073]
- HAM ; WALLACE. *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0073]
- BARNES ; SATO. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0073]
- Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratories, 1988 [0079]
- MILLSTEIN et al. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0084]
- TRAUNECKER et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0085]
- SURESH et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0087]
- BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0089]
- SHALABY et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0090]
- KOSTELNY et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0091]
- HOLLINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0093]
- GRUBER et al. *J. Immunology*, 1994, vol. 152, 5368 [0093]
- TUTT et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0093]
- PIETU et al. *Genome Res.*, June 1996, vol. 6, 492-503 [0101]
- ZHAO et al. *Gene*, 24 April 1995, vol. 156, 207-213 [0101]
- SOARES. *Curr. Opin. Biotechnol.*, October 1997, vol. 8, 542-546 [0101]
- RAVAL. *J. Pharmacol Toxicol Methods*, November 1994, vol. 32, 125-127 [0101]
- CHALIFOUR et al. *Anal. Biochem*, 01 February 1994, vol. 216, 299-304 [0101]
- STOLZ ; TUAN. *Mol. Biotechnol.*, December 1996, vol. 0

6, 225-230 [0101]

- HONG et al. *Bioscience Reports*, 1982, vol. 2, 907 [0101]
- MCGRAW. *Anal. Biochem.*, 1984, vol. 143, 298 [0101]
- HOLLOWAY et al. *Nature Genetics Suppl.*, 2002, vol. 32, 481-89 [0102]
- CHURCHILL. *Nature Genetics Suppl.*, 2002, vol. 32, 490-95 [0102]
- QUACKENBUSH. *Nature Genetics Suppl.*, 2002, vol. 32, 496-501 [0102]
- SLONIM. *Nature Genetics Suppl.*, 2002, vol. 32, 502-08 [0102]
- CHUAQUI et al. *Nature Genetics Suppl.*, 2002, vol. 32, 509-514 [0102]
- TAN et al. *Arthritis Rheumatol.*, 1982, vol. 25, 1271-1277 [0104]
- Remitgtorz's Pharmaceutical Science. 1980 [0121]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0123]

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* de predizer a probabilidade dum indivíduo ter lúpus eritematoso sistémico (LES) pela deteção do aumento dos níveis séricos de heterotrímico (HT) BLYS/APRIL dum indivíduo, que compreende:

(a) medição do nível de HT numa amostra de soro de teste do indivíduo em que a deteção de níveis de heterotrímico BLYS/APRIL compreende o contacto da amostra de soro com um anticorpo imobilizado que se liga especificamente a uma das subunidades de HT e subsequentemente contactando as moléculas ligadas com um anticorpo detetável que se liga especificamente à outra subunidade de HT, em que a ligação a ambos os anticorpos indica a presença de heterotrímico (HT) BLYS/APRIL;

(b) comparar esse nível ao nível de HT numa amostra de soro dum controlo saudável; e

(c) determinar se o nível de HT na amostra de soro de teste aumentou em comparação com o nível na amostra de soro de controlo;

em que os referidos níveis aumentados de HT estão associados com lúpus eritematoso sistémico (LES).

2. Um método *in vitro* para predizer a probabilidade dum paciente responder a um tratamento com fármacos para lúpus eritematoso sistémico (LES), em que o tratamento com fármacos compreende a inibição de BLYS e/ou APRIL, que compreende:

determinar o nível de heterotrímico (HT) BLYS/APRIL numa amostra de soro do paciente, em que a deteção dos níveis de heterotrímico (HT) BLYS/APRIL compreende o contacto da amostra de soro com um anticorpo imobilizado que se liga especificamente a uma das subunidades de HT e subsequentemente contactando as moléculas ligadas com um anticorpo detetável que se liga especificamente à outra

subunidade de HT, em que a ligação a ambos os anticorpos indica a presença de heterotrímero (HT) BLYS/APRIL; em que a presença de níveis elevados de HT na amostra de soro do paciente em comparação com uma amostra de soro de controlo é preditivo da probabilidade do paciente responder ao tratamento com fármacos para a condição patológica.

3. O método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a referida determinação é feita utilizando um ensaio baseado em contas.

4. O método de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tratamento com fármacos compreende um antagonista HT que compreende uma região do domínio extracelular de TACI que compreende os aminoácidos 30-110 da SEQ ID NO:2 fundida na estrutura a uma porção Fc duma imunoglobulina.

5. O método de acordo com a reivindicação 4, em que o referido antagonista HT é um antagonista BLYS.

6. O método de acordo com a reivindicação 4, em que o referido antagonista HT é um antagonista APRIL.

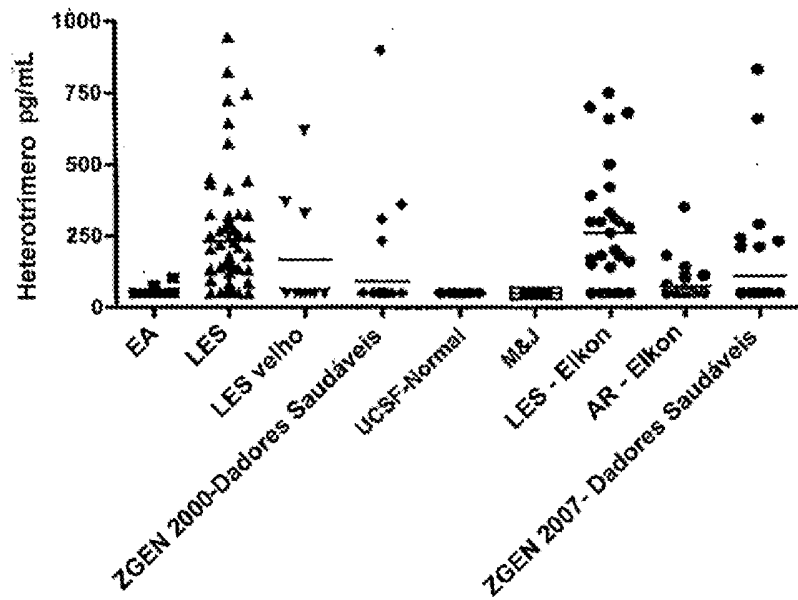


FIGURA 1

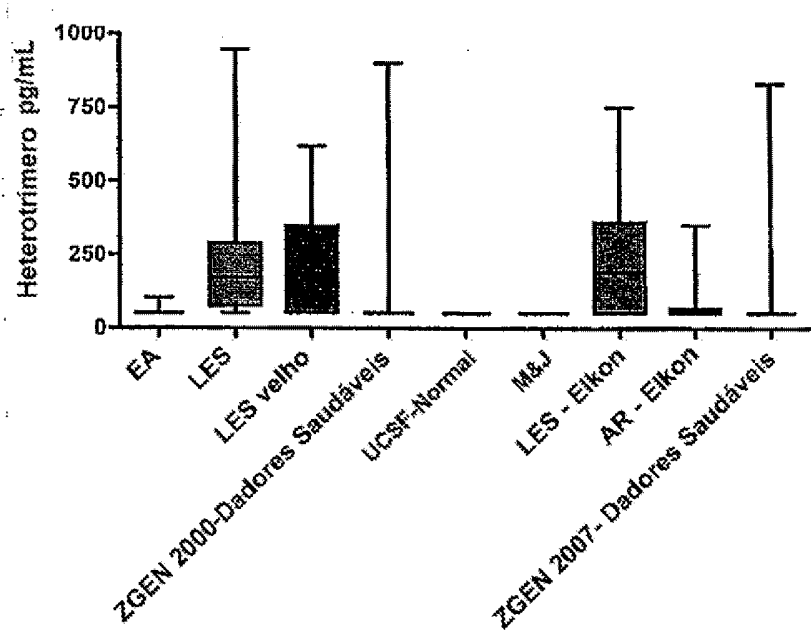


FIGURA 2

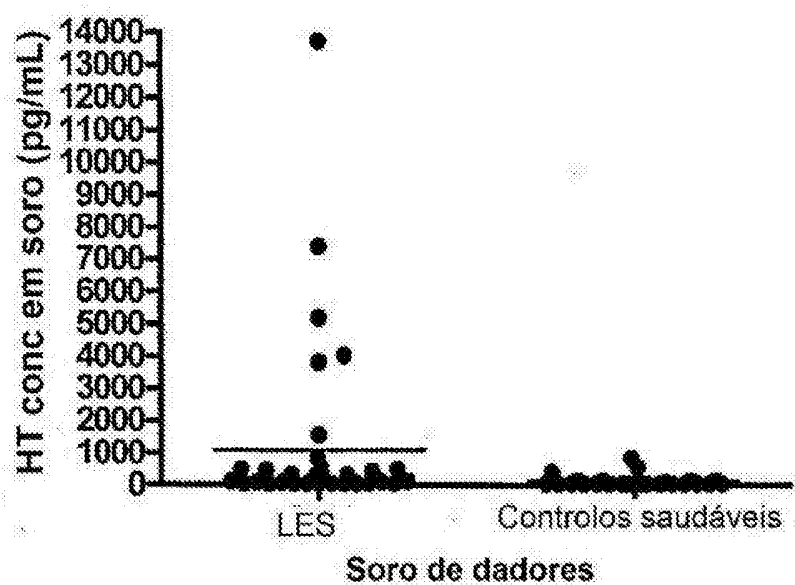


FIGURA 3