



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 051**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01979395 .9**

96 Fecha de presentación : **02.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1326896**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54

Título: **Anticuerpos humanos anti-CD40.**

30

Prioridad: **02.10.2000 US 237556 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73

Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, Inc.
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72

Inventor/es: **Chu, Keting;**
Wang, Changyu;
Yoshihara, Corrine y
Donnelly, John, J.

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 357 051 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

ANTICUERPOS HUMANOS ANTI-CD40

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

Campo de la Invención

- 5 La invención se relaciona con anticuerpos humanos que son capaces de unirse al CD40, métodos para utilizar los anticuerpos, y el tratamiento de la enfermedad mediada por el anticuerpo en humanos.

Descripción de la Técnica Relacionada

- 10 El antígeno CD40 es una glucoproteína expresada en la superficie celular de células B y otras células, que incluye células dendríticas. Durante la diferenciación de la célula B, la molécula se expresa primero en células pre-B y luego desaparece de la superficie celular cuando la célula B llega a ser una célula de plasma. La reticulación de las moléculas CD40 con anticuerpos anti-CD40 media una variedad de efectos en células B. Se sabe que el antígeno CD40 se relaciona con el receptor del factor de crecimiento nervioso humano (NGF) y el receptor de factor de necrosis de tumor α (TNF- α), que sugiere que el CD40 es un receptor para un ligando con funciones importantes en la activación de célula B.

- 15 El CD40 es un elemento clave de respuestas inmunes. La conexión del CD40 en células que presentan antígeno mediante su ligando, denominado CD40L o CD154, origina la producción de citoquinas y la sobrerregulación de las moléculas coestimuladoras que conduce a la activación eficiente de linfocitos T. La conexión del CD40 en linfocitos B proporciona una señal coestimuladora para la célula B que conduce a la producción de anticuerpo. Así el bloqueo de la conexión y activación CD40 tiene el potencial para suprimir el anticuerpo y las respuestas inmunes a la mediación celular. Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 se pueden utilizar para tratar la enfermedad autoinmune tal como lupus sistémico, soriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn), y artritis reumatoide. Tales anticuerpos también se pueden utilizar para evitar el rechazo de injertos de órgano y tejido al suprimir las autorespuestas inmunes, para tratar linfomas al privar los linfocitos B malignos de la señal activante proporcionada por CD40, y para suministrar toxinas a células que llevan CD40 en una forma específica.

- 25 Previamente, se han descrito anticuerpos monoclonales de ratón tal como 5D2 que unen a CD40 sin proporcionar una señal activante. Estos anticuerpos tienen la capacidad de inhibir respuestas inmunes *in vivo e in vitro*. Sin embargo los anticuerpos de ratón no se pueden utilizar para tratar la enfermedad humana debido a que ellos provocan anticuerpos anti-ratón humanos que ocultan la efectividad del tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de anticuerpos de especificidad comparables pero que se componen de una secuencia de aminoácido humana.

30 La EP0945465 describe anticuerpos que son capaces de unirse a CD40, métodos para producir estos anticuerpos, y métodos para su uso.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

- 35 La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula B humana normal, dicho anticuerpo monoclonal o fragmento está libre de actividad agonística significativa cuando dicho anticuerpo monoclonal o fragmento se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B normal, por lo cual, cuando dicho anticuerpo monoclonal o fragmento se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B normal, el crecimiento o diferenciación de dicha célula B normal se inhibe, en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que contiene residuos 31-35, 50-66, y 99-111 de la SEQ ID NO:13, y comprende una región variable de cadena liviana que contiene residuos 24-39, 55-61, y 94-102 de la SEQ ID NO:17.

- 45 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención para uso en terapia.

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención para uso en (i) evitar o tratar una enfermedad mediada por el anticuerpo en un paciente, (ii) evitar o tratar una enfermedad mediada por IgE en un paciente, o (iii) evitar o tratar una enfermedad autoinmune en un paciente.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención en la fabricación de un medicamento para (i) evitar o tratar una enfermedad mediada por el anticuerpo en un paciente, (ii) evitar o tratar una enfermedad mediada por IgE en un paciente, o (iii) evitar o tratar una enfermedad autoinmune en un paciente.

- 5 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención para uso en inhibir la producción de anticuerpo mediante células B en un paciente humano.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpo mediante células B en un paciente humano.

- 10 La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento o diferenciación de una célula B humana normal, o para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en donde dicha proliferación se aumenta mediante la interacción de un ligando CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de una célula B, dicho método que comprende poner en contacto dicha célula B *in vitro con* una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano o fragmento del mismo de la invención.

- 15 La invención también proporciona un hibridoma que es capaz de producir el anticuerpo monoclonal humano de la invención.

La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención, que comprende las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO: 8.

- 20 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos de la siguiente descripción que no se relacionan específicamente con la invención reivindicada son para comparación e ilustración.

25 BREVE RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

Se describe aquí un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse a un antígeno CD40 humano ubicado en la superficie de una célula B humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 evita el crecimiento o diferenciación de la célula B.

- 30 También se describe aquí un método para evitar o tratar una enfermedad mediada por el anticuerpo en un paciente, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse a un antígeno CD40 humano ubicado en la superficie de una célula que lleva CD40 tal como una célula B humana o una célula dendrítica humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 evita el crecimiento o diferenciación de la célula, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 35 También se describe aquí un método para evitar o tratar una enfermedad mediada por IgE tal como una alergia en un paciente, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse a un antígeno CD40 humano ubicado en la superficie de una célula B humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 evita el crecimiento o diferenciación de la célula B, in un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 También se describe aquí un método para evitar o tratar una enfermedad autoinmune en un paciente, que incluye una enfermedad mediada por el anticuerpo, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse a un antígeno CD40 humano ubicado en la superficie de una célula B humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 evita el crecimiento o diferenciación de la célula B, en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las enfermedades autoinmunes particulares contempladas para tratamiento mediante este método incluyen lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), y púrpura trombocitopénica idiopática (ITP).

También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento de células de tumor, que incluye linfoma No Hodgkins.

En realizaciones más preferidas de la anterior descripción, el anticuerpo monoclonal es 15B8, 20C4, 13E4, 12D9, o 9F7.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una gráfica de barras que ilustra el efecto de anticuerpos anti-CD40 en la proliferación de células B estimuladas por células que expresan CD40L.

La figura 2 es una gráfica de barras que ilustra el efecto de anticuerpos anti-CD40 en la proliferación de célula B.

10 La figura 3 es una gráfica de barras que ilustra el efecto de anticuerpos CD40 en la proliferación de célula B que induce anti-IgM.

La figura 4 es una gráfica de barras que ilustra el efecto del anticuerpo anti-CD40 reticulado en la proliferación de células B periféricas humanas.

15 La figura 5 es una comparación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas livianas de los cinco anticuerpos humanos anti-CD40 y 5H7.

La figura 6 es una comparación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de cinco anticuerpos humanos anti-CD40 y 5H7.

20 La figura 7 muestra los resultados de análisis FACS del anticuerpo monoclonal que se une a las células que expresan CD40, 15B8, que muestra que el anticuerpo que tiñe células sanguíneas periféricas de tres especies: humanos; macaco de la india; y macaco de Java.

La figura 8 proporciona el ADN y las secuencias de aminoácido para la región vK del anticuerpo monoclonal humano 12D9.

La figura 9 proporciona el ADN y las secuencias de aminoácido para la región constante de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 12D9, SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente.

25 La figura 10 proporciona las secuencias de ADN para las regiones vK.1 y vh1 del anticuerpo monoclonal humano 20C4, SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente.

La figura 11 proporciona las secuencias de ADN para las regiones vK.1 y vh1 del anticuerpo monoclonal humano 9F7, SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente.

30 La figura 12 proporciona las secuencias de ADN para las regiones vK.3 y vh1 del anticuerpo monoclonal humano 15B8, SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente.

La figura 13 proporciona la secuencia de ADN para las regiones vh1 de anticuerpos monoclonales humanos 13E4 y 12D9 (SEQ ID NO: 10).

La figura 14 proporciona la secuencia de aminoácidos para las siguientes regiones de los anticuerpos monoclonales humanos indicados:

35 9F7VH1: SEQ ID NO:11

12D9VH1: SEQ ID NO:12

15B8VH1 SEQ ID NO:13

20C4VH1: SEQ ID NO:14

9F7VK1: SEQ ID NO:15

40 12D9VK1: SEQ ID NO:16

15B8VK1: SEQ ID NO:17

20C4VK1: SEQ ID NO:18.

La figura 15 muestra que el anticuerpo anti-CD40 MS81 estimula la proliferación de células NHL en la presencia y ausencia de IL-4, utilizando las células de un paciente.

La figura 16 muestra que el anticuerpo anti-CD40 MS81 estimula la proliferación de las células NHL en la presencia y ausencia de IL-4, utilizando las células de un segundo paciente.

5 La figura 17 muestra que el anticuerpo anti-CD40 15B8 inhibe la proliferación de las células NHL en un paciente.

La figura 18 muestra la respuesta de dosis para 15B8 en la proliferación de las células NHL de un paciente sensible a rituxan. Las células se estimulan con CD40L y IL-4.

10 La figura 19 muestra las curvas de respuesta de dosis representativas para el efecto de 15B8 en la proliferación de células B humanas estimuladas por CD40L utilizando las células de tres individuos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se construyen anticuerpos de varias regiones, una región crucial que es la región determinante de complementariedad, o CDR. La frase "región determinante de complementariedad" se refiere a las secuencias de aminoácido que juntas definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativo. Ver, *por ejemplo*, Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publicación No. 91-3242 (1991). La frase "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En el trabajo previo dirigido hacia producir anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedad humana, las regiones constantes de ratón se sustituyen por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados objeto se derivan de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados todavía provocan una respuesta potencialmente peligrosa y no esperada en humanos y existe una pérdida de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD40 de la actual descripción supera los resultados de los anticuerpos monoclonales de la técnica anterior. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos monoclonales humanos descritos aquí producidos preferiblemente utilizando animales transgénicos que se construyen por ingeniería para contener el locus de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, la WO 98/24893 describe animales transgénicos que tienen un locus Ig humano en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación del locus de cadena pesada y liviana endógena. La WO 91/10741 también describe anfitriones mamíferos no primates transgénicos que son capaces de montar una respuesta inmune a un inmunógeno, en donde los anticuerpos tienen las regiones variable y/o constante de primate, y en donde el locus que codifica la inmunoglobulina endógena se sustituye o se inactiva. La WO 94/02602 describe anfitriones de mamífero no humano que tienen el locus Ig endógeno inactivado y el locus Ig humano funcional. La Patente Estadounidense No. 5,939,598 describe métodos para elaborar ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un locus de inmunoglobulina exógena que comprende una o más regiones constantes xenogéneas.

Utilizando un animal transgénico descrito anteriormente, se puede producir una respuesta inmune para una molécula antigénica seleccionada, en este caso el CD40, y las células que producen el anticuerpo se pueden remover del animal y se utilizan para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes, y similares se conocen en la técnica, y se utilizan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico como se describe en la WO96/33735. Los anticuerpos monoclonales se pueden probar por su capacidad de inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la proteína correspondiente.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, y sus fragmentos tal como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que retienen la función de unión a antígeno del anticuerpo padre.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpo homogénea. El término no se limita con respecto a las especies o fuente del anticuerpo, ni está destinado a estar limitado en esta forma en la que se hace. El término abarca inmunoglobulinas completas así como también fragmentos tal como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros que retienen la función de unión a antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero se puede utilizar en esta descripción. En la práctica, sin embargo, los anticuerpos serán típicamente de origen de rata o murino debido a la disponibilidad de estirpes celulares de rata o murino para

uso en elaborar las estirpes celulares híbridas requeridas o hibridomas para producir anticuerpos monoclonales.

5 Como se utiliza aquí, el término "anticuerpos monocatenarios" se refiere a anticuerpos preparados para determinar los dominios de unión (cadenas pesada y liviana) de un anticuerpo de unión, y suministrar un grupo funcional de ligado que permite la conservación de la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solo parte del dominio variable necesario para unirse al antígeno. La determinación y construcción de los anticuerpos monocatenarios se describen en la Patente Estadounidense No. 4,946,778 de Ladner et al.

10 El término "epítopo de antígeno CD40" como se utiliza aquí se refiere a una molécula que es capaz de inmunoreactividad con los anticuerpos monoclonales anti-CD40 de esta invención, excluyendo el antígeno CD40 en sí mismo. Los epítopos de antígeno CD40 pueden comprender proteínas, fragmentos de proteína, péptidos, carbohidratos, lípidos, y otras moléculas, pero para los propósitos de la actual descripción son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, imitadores de oligopéptido (*es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión de anticuerpo del antígeno CD40*), o sus combinaciones. Se describen imitadores de oligopéptido adecuados, *interalia*, en la publicación Internacional No. WO91/19735.

15 Los anticuerpos de la actual descripción se producen mediante locus de inmunoglobulina humana que lleva ratones transgénicos, y unen a un antígeno CD40 humano en la superficie de una célula humana, particularmente una célula B. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, y sus fragmentos.

20 Los anticuerpos monoclonales 15B8, 20C4, 13E4, 12D9, y 9F7 se preparan como se describe en los Ejemplos. Otros anticuerpos se pueden preparar de forma similar utilizando ratones transgénicos para locus de inmunoglobulina humana o mediante otros métodos conocidos en la técnica y/o descritos aquí.

25 Se puede prepara suero policlonal mediante métodos convencionales. En general, una solución que contiene el antígeno CD40 se utiliza primero para inmunizar un animal adecuado, en la actual descripción un animal transgénico, preferiblemente un *ratón* que lleva el locus de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, las células Sf9 que expresan CD40 se utilizan como el inmunógeno. La inmunización también se puede desarrollar al mezclar o emulsificar la solución que contiene el antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectar la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente subcutáneamente o intramuscularmente). Una dosis de 50-200 mg/inyección es típicamente suficiente. La inmunización generalmente se inocula 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferiblemente utilizando adyuvante incompleto de Freund. Uno puede generar alternativamente anticuerpos mediante inmunización *in vitro* utilizando los métodos conocidos en la técnica, para los cuales se considera equivalente esta descripción para inmunización *in vivo*.

35 Se obtiene antisuero policlonal al desangrar el animal inmunizado en un contenedor de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido por incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera mediante centrifugación (*por ejemplo*, 1,000 x g durante 10 minutos). Se puede obtener aproximadamente 20-50 ml por sangrado de conejos.

40 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando el método de Kohler y Milstein, Nature 256:495-96 (1975), o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón como se describió anteriormente. Sin embargo, a diferencia del sangrado del animal para extraer el suero, el bazo (y opcionalmente varios nodos linfáticos grandes) se remueven y disocian en células únicas. Si se desea, las células del bazo se pueden detectar (después de la remoción de células adherentes no específicas) al aplicar una suspensión celular en una placa o pozo cubierto con el antígeno de proteína. Las células B que expresan inmunoglobulina vinculada a la membrana específica para el antígeno que une a la placa, y no se enjuagan con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, luego se introducen para fusionar con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (*por ejemplo*, hipoxantina, aminopterina, medio timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas mediante dilución limitante, y se evalúan para la producción de anticuerpos que unen específicamente al antígeno de superficie celular inmunizante deseado (y que no une a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan MAb seleccionados luego se cultivan *in vitro* (*por ejemplo*, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascitos en ratones).

- 5 Como una alternativa al uso de hibridomas, se puede producir el anticuerpo en una estirpe celular tal como una estirpe celular CHO, como se describe en la Patente Estadounidense Nos. 5,545,403, 5,545,405, y 5,998,144. En resumen, la estirpe celular se transfecta con vectores que son capaces de que expresan una cadena liviana y una cadena pesada, respectivamente. Al transfectar las dos proteínas en vectores separados, se pueden producir anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glucosilación correcta del anticuerpo.
- 10 Preferiblemente, los anticuerpos completamente humanos para CD40 se obtienen al inmunizar ratones transgénicos. Un tal ratón se denomina como Xenoración, y se describe en la Patente Estadounidense Nos. 6,075,181; 6,091,001; y 6,114,598. Para producir los anticuerpos descritos aquí, los ratones transgénicos para el locus de cadena pesada humana IgG2 y el locus de cadena liviana humana K se inmunizan con células Sf9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos.
- 15 La producción de las células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) se describe en de Boer, la Patente Estadounidense No. 6,004,552. En resumen, las secuencias que codifican el CD40 humano se recombinan en un baculovirus utilizando vectores de transferencia como se describe por de Boer. Los plásmidos se cotransfectan con ADN de baculovirus tipo natural en células Sf9. Las células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante se identifican y se purifican clonalmente.
- 20 Se inyectan ratones intraperitonealmente (IP) en el día 0 y día 14 con 5×10^6 células Sf9 que expresan CD40. Se hace una inyección final por lo menos cinco semanas después, y las células del bazo y timo se remueven y se utilizan para fusión celular. La fusión celular se lleva a cabo como se describe por de Boer. Se detectan anticuerpos de hibridoma como se describe en los Ejemplos. Se seleccionan cinco hibridomas para estudio adicional, con base en su capacidad de inhibir la proliferación de células B de sangre periférica humana inducida por el ligando CD40 (CD40L) y anti-IgM, y su capacidad de inhibir la producción de IgM mediante células B de sangre periférica humana estimulada con las células T de sangre periférica humana activadas con anti-CD3.
- 25 Los cinco hibridomas que muestran la actividad inhibidora óptima se designan 15B8.8.6 (15B8), 20C4.1.6 (20C4), 13E4.12.11 (13E4), 12D9.9.10 (12D9), 9F7.9.11.1 (9F7), y 15B8.7.2. Ninguno de estos hibridomas muestran capacidad significativa para inducir la proliferación en las células B sanguíneas periféricas humanas restantes.
- 30 Las propiedades de unión relativa de estos anticuerpos de hibridoma se examina mediante citometría de flujo, como se describe en detalle en los Ejemplos. En resumen, los anticuerpos comparados con las diferencias exhibidas en afinidad a pesar de su capacidad de reconocer los mismos o epítomos cercanamente relacionados. Por ejemplo, el MAb 15B8 bloquea la unión de MAb 20C4 a linfocitos de sangre periférica C20+ humanos, pero el MAb 20C4 no bloquea el MAb 15B8 que se une a los linfocitos C20+. La unión de hibridomas CD40 diferenciales se muestra en la Tabla 4 (Ejemplo 4).
- 35 Cuatro hibridomas probados (15B8, 20C4, 12D9, y 9F7) producen anticuerpos monoclonales que tiñen células sanguíneas periféricas de tres especies: humanos; macaco de la india; y macacos de Java (Figura 7).
- 40 Para determinar las secuencias de polinucleótido que codifican los anticuerpos monoclonales, se prepara mRNA a partir de los hibridomas y se desarrolla RT-PCR en ellos utilizando los procedimientos estándar de ARN. Los productos PCR se analizan en geles, se secuencian, y se trasladan. El polinucleótido y las secuencias de aminoácido se proporcionan en la SEQ ID NOs: 1-18, como se muestra en la Tabla 7, Ejemplo 11.
- 45 Las secuencias de aminoácido de cinco anticuerpos monoclonales (9F7, 15B8, 12D9, 20C4, y 13E4) se comparan con la secuencia de aminoácido de anticuerpo anti-CD40 monoclonal 5H7 de ratón, como se muestra en las Figuras 5 (cadenas livianas) y 6 (cadenas pesadas).
- 50 Los resultados obtenidos utilizando los cinco anticuerpos monoclonales descritos indican que estos anticuerpos, así como también fragmentos y sus formas quiméricas, tienen características antagonísticas que los hace adecuados para un número de aplicaciones clínicas, que incluye el tratamiento de enfermedades autoinmunes, el tratamiento de rechazos y rechazos de trasplante, como terapias adyuvantes para terapias de gen y terapias de proteína, y en inhibir el crecimiento de células de tumor, que incluye células de Linfoma No Hodgkins. Los usos adicionales incluyen el tratamiento de cualquier enfermedad mediada por una célula maligna que expresa CD40, y el uso para tratar enfermedades que se

relacionan con la proliferación, activación, o regulación de las células que expresan CD40. La actividad de los cinco MAb se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

Clones	Inhibición IgM de Secreción de células B	Inhibición en proliferación de células Jurkat estimuladas con células B	Inhibición en la proliferación de células CHO-CD40L estimuladas con células B	Estimulación en la proliferación de células B estimuladas anti-higM	Estimulación en la proliferación de células B	Reticulación de Ab para estimular la proliferación de células B
MS81 12D9.9.10	-29%	-64%	-24%	190%	178%	120%
MS81 15B8.8.6.12	-47%	-81%	-89%	352%	513%	76%
MS81 20C4.1.6	-35%	-74%	-97%	237%	279%	143%
MS81 13E4.12.11	-44%	-50%	n/a	346%	660%	n/a
MS81 9F7.9.11.1	-30%	-71%	-57%	120%	275%	84%

* Se muestran datos representativos de los anticuerpos en 1mg/ml

- 5 La descripción no solo abarca los cinco anticuerpos monoclonales descritos aquí, sino también anticuerpos que difieren de estos pero que retienen el CDR; y anticuerpos con una o más adiciones, eliminaciones, o sustituciones de aminoácido, en donde la actividad se mide mediante la inhibición de proliferación y/o secreción de anticuerpo de célula B. La descripción también abarca anticuerpos desimmunizados, que se pueden producir como se describe en, por ejemplo, la WO98/52976, "Method for the Production of Non-Immuno-genic Proteins," también descrito aquí son proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo monoclonal de la descripción, o un fragmento del mismo, cuyas proteínas de fusión se pueden sintetizar o expresar a partir de los vectores de polinucleótido correspondientes, como se conoce en la técnica.

- 10 Los anticuerpos de la actual descripción pueden tener variaciones de secuencia producidas utilizando los métodos descritos en, por ejemplo, la Publicación de Patente Nos. EP 0 983 303 A1, WO 00/34317, y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias dentro del CDR pueden originar un anticuerpo que une un MHC Clase II y activar una respuesta de célula T auxiliar no esperada. Una sustitución conservadora puede permitir al anticuerpo retener la actividad de unión que todavía pierde su capacidad de activar una respuesta de célula T no esperada. Cualesquier tales sustituciones conservadora o no conservadora se pueden hacer utilizando los métodos reconocidos en la técnica, y los anticuerpos resultantes caben dentro del alcance de la descripción.

- 15 También se describen aquí las secuencias de aminoácido para las cadenas livianas y cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales preferidos (SEQ ID NOS. 1-18). Las secuencias se alinean como se muestra en las Figuras 5 y 6. Estas alineaciones indican las posiciones de aminoácido específicas que son más agradables para sustitución sin pérdida de las actividades biológicas deseadas del anticuerpo. Utilizando solo métodos de rutina, un experto en la técnica puede construir plásmidos que codificarán variantes de estas secuencias. Los anticuerpos variantes se pueden probar de forma rutinaria para actividad antagónica, afinidad, especificidad, y actividad agonística utilizando los métodos descritos aquí.

- 20 Un anticuerpo producido mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, o cualquier otro método no descrito aquí, caerá dentro del alcance de esta descripción si este posee por lo menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas estimuladas por células T; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células T Jurkat; e inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células que expresan CD40L. Estos ensayos se pueden desarrollar como se describe en los Ejemplos aquí.

- 25 30 35 Los anticuerpos también exhibirán una afinidad de unión de único sitio (K_D) de por lo menos 10^{-5} M, preferiblemente por lo menos 10^{-6} - 10^{-7} M, más preferiblemente por lo menos 10^{-8} M, y más preferiblemente por lo menos 10^{-9} M, tal como 10^{-10} M, como se mide utilizando un ensayo estándar tal como Biacore, que se conoce en la técnica, en comparación con controles apropiados. También se puede alcanzar la afinidad

de unión de 10^{-11} M, 10^{-13} M, 10^{-15} M, 10^{-17} M y 10^{-19} M también. Estos ensayos son automáticos, y permiten la medición de especificidad y reactividad cruzada de MAb, que también se puede evaluar utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. Los detalles de los ensayos Biacore se proporcionan en los Métodos de Biacore "BIA applications handbook." descritos en la WO 01/27160 que se pueden utilizar para modular la afinidad de unión.

Si se desea, los anticuerpos (sin son policlonales o monoclonales) se pueden marcar utilizando técnicas convencionales. Las marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ^{32}P y ^{125}I), reactivos densos de electrón, enzimas, y ligandos que tienen patrones de unión específicos. Las enzimas se detectan típicamente mediante su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano se detecta usualmente mediante su capacidad de convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. "Patrón de unión específico" se refiere a una proteína que es capaces de unir una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico. Otros patrones de unión específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y los numerosos acoples de ligando del receptor conocidos en la técnica. Se debe entender que la descripción anterior no significa categorizar las varias marcas en distintas clases, cuando la misma marca puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, el ^{125}I puede servir como una etiqueta radioactiva o como un reactivo denso de electrón. El HRP puede servir como enzima o como antígeno para un MAb. Adicionalmente, uno puede combinar varias marcas para el efecto deseado. Por ejemplo, los MAb y avidina también requieren marcas en la práctica de esta invención: así, uno puede marcar un MAb con biotina, y detectar su presencia con marca de avidina con ^{125}I , o con una antibiotina MAb marcada con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para aquellos medianamente expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la descripción actual.

Los anticuerpos para uso en la descripción se pueden producir utilizando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, la WO01/27160 describe un método para conferir afinidad de unión CDR donante en una estructura de región variable de anticuerpo receptora. El método también se puede utilizar para optimizar la afinidad de unión de una región variable o un anticuerpo, tal como para mejorar la afinidad de unión. Los métodos para producir anticuerpos humanizados que tienen uno o más CDR se describen en la Patente Estadounidense No. 6,180,370. Los métodos para producir anticuerpos que se han optimizado para la administración a humanos se describen en la WO 00/34317, que describe la producción de proteínas que se presentan menos inmunogénicas o no inmunogénicas. La Patente Estadounidense No. 5,514,548 describe métodos para la selección de proteínas de unión de ligando, tal como anticuerpos, que se unen con alta afinidad a un ligando objetivo. La Patente Estadounidense No. 5,877,397 describe animales no humanos transgénicos que son capaces de producir anticuerpos heterólogos.

35 FORMULACIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

Los anticuerpos de esta descripción se administran en una concentración que es terapéuticamente efectiva para evitar o tratar la enfermedad mediada por los anticuerpos tal como alergias, SLE, PBC, ITP, esclerosis múltiple, soriasis, Enfermedad de Crohn, rechazo de injerto, y linfoma de célula B. Para alcanzar este objetivo, los anticuerpos se pueden formular utilizando una variedad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se administran mediante inyección, ya sea intravenosamente o intraperitonealmente. Los métodos para llevar a cabo esta administración se conocen por aquellos medianamente expertos en la técnica. También puede ser posible obtener composiciones que se pueden administrar tópicamente u oralmente, o que pueden ser capaces de transmisión a través de las membranas de mucosa.

Antes de la administración a los pacientes, las formulaciones se pueden agregar a los anticuerpos. Se prefiere una formulación líquida. Por ejemplo, estas formaciones pueden incluir aceites, polímeros, vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, sales, amortiguadores, albúmina, tensoactivos, o agentes formadores de masa. Preferiblemente los carbohidratos incluyen azúcar o alcoholes de azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua. Los sacáridos o glucanos puede incluir fructosa, dextrosa, lactosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, alfa y beta ciclodextrina, almidón soluble, almidón hidroxetilo y carboximetilcelulosa, o sus mezclas. Es más preferida la sacarosa. "Alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C_4 a C_8 que tiene un grupo --OH e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol, y arabitol. Es más preferido manitol. Estos azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existe límite fijo para la cantidad utilizada tanto como el azúcar o el alcohol de azúcar que es soluble en la preparación acuosa. Preferiblemente, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar está

- entre 1.0 p/v % y 7.0 p/v %, más preferiblemente entre 2.0 y 6.0 p/v %. Preferiblemente los aminoácidos incluyen formas levorotarias (L) de carnitina, arginina, y betaína; sin embargo, se pueden agregar otros aminoácidos. Los polímeros preferidos incluyen povidona (PVP) con un peso molecular promedio entre 2,000 y 3,000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio entre 3,000 y 5,000. También se prefiere utilizar un amortiguador en la composición para minimizar los cambios en el pH en la solución antes de liofilización o después de reconstitución. Se puede utilizar más de cualquier amortiguador fisiológico, pero se prefieren citrato, fosfato, succinato, y amortiguadores de glutamato o sus mezclas. Es más preferido un amortiguador de citrato. Preferiblemente, la concentración es de 0.01 a 0.3 molar. Los tensoactivos que se pueden agregar a la formulación se muestran en la EP Nos. 270,799 y 268,110.
- Adicionalmente, los anticuerpos se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente a un polímero para incrementar su vida útil circulante, por ejemplo. Los polímeros, y métodos preferidos ligados a estos péptidos, se muestran en la Patente Estadounidense Nos. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; y 4,609,546.
- Los polímeros preferidos son polioles polioxetilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la Fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ en donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferiblemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, más preferiblemente este es metilo. El símbolo n es un entero positivo, preferiblemente entre 1 y 1,000, más preferiblemente entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido entre 1000 y 40,000, más preferiblemente entre 2000 y 20,000, más preferiblemente entre 3,000 y 12,000. Preferiblemente, el PEG tiene por lo menos un grupo hidroxilo, más preferiblemente este es un grupo hidroxilo terminal. Este grupo hidroxilo que se activa preferiblemente se hace reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y cantidad de los grupos reactivos se pueden variar para alcanzar un PEG/anticuerpo covalentemente conjugado de la presente invención.
- También se utilizan polioles polioxetilados solubles en agua útiles en la presente invención. Ellos incluyen sorbitol polioxilado, glucosa polioxilada, glicerol polioxilado (POG), etc. Se prefiere POG. Una razón es debido a que la estructura de glicerol de glicerol polioxilado es la misma estructura de ocurrencia natural en, por ejemplo, animales y humanos en mono-, di-, triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no es necesariamente vista como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular preferido en el mismo rango como PEG. La estructura para POG se muestra en Knauf et al., J. Bio. Chem. 263:15064-15070 (1988), y una discusión de conjugados POG/IL-2 se encuentra en la Patente Estadounidense No. 4,766,106.
- Otro sistema de suministro de fármaco para incrementar la vida útil circulante es la liposoma. Los métodos para preparar los sistemas de suministro de liposoma se discuten en Gabizon et al., Cancer Research 42:4734 (1982); Cafiso, Biochem Biophys Acta 649: 129 (1981); y Szoka, Ann Rev Biophys Eng 9:467 (1980). Se conocen otros sistemas de suministro de fármaco en la técnica y se describen en, *por ejemplo*, Poznansky et al., Drug Delivery Systems (R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y. 1980), pp. 253-315; M. L. Poznansky, Pharm Revs 36:277 (1984).
- Después que se prepara la composición farmacéutica líquida, esta se liofiliza preferiblemente para evitar degradación y para preservar la esterilidad. Los métodos para liofilizar las composiciones líquidas se conocen por aquellos expertos en la técnica. Justo antes de uso, la composición se puede reconstituir con un diluyente estéril (solución de Ringer, agua destilada, o solución salina estéril, por ejemplo) que puede incluir ingredientes adicionales. Luego de reconstitución, la composición se administra preferiblemente a los sujetos utilizando aquellos métodos que se conocen por aquellos expertos en la técnica.
- Como se indicó anteriormente, los anticuerpos y composiciones de esta invención se pueden utilizar para tratar pacientes humanos para evitar o para tratar la enfermedad mediada por los anticuerpos tal como alergias, SLE, PBC y ITP. La ruta preferida de administración es parenteralmente. En la administración parenteral, las composiciones de esta invención se formularán en una dosificación unitaria inyectable de tal como una solución, suspensión o emulsión, en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Ejemplos de tales vehículos son solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hanks. También se pueden utilizar vehículos no acuosos tal como aceites fijos y etiloleato. Un vehículo preferido es 5% de dextrosa en solución salina. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos tal como sustancias que mejoran la isotonicidad y estabilidad química, que incluye amortiguantes y conservantes.

La dosificación y el modo de administración dependerán del individuo. Generalmente, las composiciones se administran debido a que los anticuerpos se dan en una dosis entre 1 mg/kg y 20 mg/kg, más preferiblemente entre 20 mg/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 7 mg/kg. De forma adecuada, este se da como una infusión o como una dosis en bolo, para incrementar los niveles circulantes mediante 10-20 veces y durante 4-6 horas después de la dosis de bolo. También se puede utilizar infusión continua después de la dosis de bolo. Si es posible, los anticuerpos se pueden infundir en una dosis entre 5 y 20 mg/kg/minuto, más preferiblemente entre 7 y 15 mg/kg/minuto. Los regímenes de tratamiento adecuados se describen en la WO 00/27428 y la WO 00/27433.

Uso de la Terapia de Anticuerpo Anti-CD40 para Terapia de Linfoma No Hodgkins

El linfoma No Hodgkin (NHL) se origina de los componentes del bazo, el timo y los nodos linfáticos (Jandl J.H., Non-Hogkin's linfomas, in Jandl JH (ed): Blood, Textbook of Hematology, Boston, MA, Little Brown, 1996, pp. 853-887). Este consiste de un grupo de malignidades linfocíticas que se derivan principalmente de células B y células T. Los pacientes con bajo grado de NHL usualmente no responden a la quimioterapia o la terapia de radicación. Este índice de respuesta bajo y la alta probabilidad de relapso contribuye al tiempo promedio de supervivencia del paciente de poco menos de 9 años.

El imbalance de la señal de crecimiento/supervivencia mediante CD40 y la señal de muerte paralizada mediante Fas juega un papel importante en la patogenia de malignidades de linaje B de bajo grado, que incluye leucemia linfocítica crónica (CLL) y NHL (Ghia P., Adv. Cancer Res., 2000, 79:157-73). Los estudios en NHL de bajo grado sugieren que el inicio de la enfermedad es debido a la acumulación de las células de linfoma como un resultado en la reducción de apoptosis a través de la ruta Fas y se incrementa en la señal de supervivencia a través de CD40 (Ghia P., Adv. Cancer Res., 2000, 79:157-73). Esto puede explicar la insensibilidad de las células de linfoma para la quimioterapia o la terapia de radiación, que objetiva específicamente las células activamente proliferantes.

La descripción se relaciona adicionalmente con una nueva terapia NHL que comprende el uso de un anticuerpo de CD40 para bloquear la señal de supervivencia para las células NHL. Esta estrategia se soporta mediante un número de observaciones en la literatura científica publicada. El CD40 se expresa en la superficie de células B a través del desarrollo de células B. Los estudios han demostrado que el CD40 proporciona una señal de supervivencia para células B malignas y estimula su crecimiento *in vitro* (Romano M.F. et al., Leuk Lymphoma, 2000 Jan., 36(3-4):255-62; Furman R.R., J. Immunol., 2000 Feb. 15, 164(4):2200-6; Kitada S., Br. J. Haematol., 1999 Sep., 106(4):995-1004; Romano M.F., Blood, 1998 Aug. 1, 92(3):990-5; Jacob A., Leuk. Res., 1998 Apr., 22(4):379-82; Wang D., Br. J. Haematol., 1997 May, 97(2):409-17; Planken E.V., Leukemia, 1996 Mar., 10(3): 488-93; Greiner A., Am. J. Pathol., 1997 May, 150(5):1583-93). Existe evidencia de pacientes que el microambiente existe para proporcionar CD40L para señalización de CD40 *in vivo*: el CD40 se expresa en células de linfoma en 86% de pacientes con linaje B NHL (Uckun F.M., Blood, 1990 Dec. 15, 76(12):2449-56). El descubrimiento de la coexpresión de CD40/CD40L en las mismas células de linfoma B eleva la posibilidad de un bucle de señal de crecimiento autocrina en pacientes NHL (Clodi K., Br. J. Haematol., 1998 Oct., 103(1):270-5). También existe un incremento significativo en el CD40L soluble en el suero de paciente NHL (Younes A., Br. J. Haematol., 1998 Jan., 100(1):135-41). El CD40L soluble puede inducir la proliferación de células de linfoma en el cultivo de célula de linfoma NHL primario (Andersen N.S., Blood, 2000 Sep. 15, 96(6):2219-25; Buske C., Leukemia, 1997 Nov., 11(11):1862-7). Se incrementa la expresión de CD40L en la zona marginal de tumor en linfomas MALT de bajo grado (Carbone A., Am. J. Pathol., 1995 Oct., 147(4):912-22; Greiner A., Dev. Immunol., 1998, 6(3-4):17-95). Dando el alto nivel de CD40 expresado en tumores de linaje de célula B y su función como una señal de supervivencia para estas células malignas, un anticuerpo antagonista anti-CD40 puede tener valor terapéutico en NHL.

15B8, un anticuerpo monoclonal CD40 anti-humano subtipo IgG2 humano generado mediante inmunización de ratones transgénico que lleva la cadena pesada IgG2 humana demuestra la eficacia potencia en 15B8 en un modelo preclínico *in vitro* de NHL, se prueba que el 15B8 utiliza células B malignas (células NHL) obtenidas de pacientes NHL quienes son rituximab tratado o no tratado. El rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 para el tratamiento de NHL folicular o de refractario de bajo grado o de relapso.

Debido a que las células de linfoma primarias no proliferan en medio de cultivo regular y experimentan apoptosis después de unos pocos días en el cultivo, se cocultivan células de tumor con el ligando CD40 irradiado (CD40L) que transfectan células alimentadoras (Arpin, C., Science, 1995, 268:720-722) en la presencia o ausencia del crecimiento factor Interleuquina-4 de célula B (IL-4). Los anticuerpos (anti-CD40 MS81 agonista, o anti-CD40 antagonista 15B8 o isotipo de control hulgG2) de la concentración indicada (de

0.01 µg/ml a 10 µg/ml) luego se agregan al cultivo. Luego de incubación a 37°C durante 48 horas, las células cultivadas se pulsan con ³H-timidina durante 18 horas. Las células luego se cosechan y se analizan por la cantidad de incorporación de ³H-timidina (Schultz, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92:8200-8204). Todas las condiciones de muestra están en triplicado.

- 5 En estos ensayos de cultivo primario de célula NHL 15B8 solos o en combinación con IL-4 no estimulan que las células NHL se proliferen *in vitro*. En contraste, un anti-CD40 MS81 agonista induce proliferación celular NHL bajo la misma condición. El 15B8 muestra inhibición estadísticamente significativa de proliferación celular NHL estimulada por CD40L (P=0.05) y por CD40L más IL-4 (P<0.05) *in vitro*. En el rango de concentración 1-10 µg/ml o 0.1-10 µg/ml respectivamente, el 15B8 muestra una dosis estadísticamente significativa relacionada con la inhibición de proliferación celular NHL estimulada por CD40L o por CD40L más IL-4 (P<0.005).

15 Existen dos tipos de modelos preclínicos que se utilizan actualmente para la evaluación de Mab específicos de antígeno humano en el desarrollo terapéutico para linfomas. Un modelo es el modelo de ratón de xenoinjerto *in vivo*, en donde las estirpes celulares de linfoma transformado de EBV, tal como células Daudi (linfoma de Burkitt) o Raji (linfoma de Burkitt), son xenoinjerto en ratones SCID/sin pelo. Sin embargo, en estos modelos, los resultados solo reflejan efectos en la estirpe celular inmortal particular, que se deriva de una célula transformada EBV. Se sabe que las células de linfoma Burkitt son células linfoblastoides (Ambinder R.F., Cancer Treat. Res., 1999, 99:27-45; Quintanilla-Martinez L., Leuk. Lymphoma, 1998 Jun., 30(1-2):111-21; Klein G., Acta Microbiol. Immunol. Hung., 1996, 43(2-3):97-105) aunque las células de linfoma de pacientes NHL se considera que son la etapa de célula B madura (Ghia P., Adv. Cancer Res., 2000, 79:157-73). La transformación de EBV de células B resulta en cambios de muchos componentes en la ruta de señalización CD40 (Uchida J., Science, 1999 Oct. 8, 286(5438):300-3; Farrell P.J., Biomed. Pharmacother., 1997, 51(6-7):258-67). En contraste a la señalización de CD40 en las células NHL y células B normales, la señalización CD40 conduce que el crecimiento se disminuye en estirpes celulares de linfoma de Burkitt EBV transformado (Fukuda M., Viral Immunol., 2000, 13(2):215-29; Baker M.P., Blood, 1998 Oct. 15, 92(8):2830-43). Así, los resultados que prueban un anti-CD40 MAb antagonista (15B8) en los modelos de xenoinjerto no serán capaces de predecir la respuesta al anticuerpo (15B8) mediante pacientes NHL.

30 El otro modelo es el *ensayo* de inhibición de crecimiento *in Vitro* de células de linfoma de pacientes NHL, como aquel utilizado aquí. La ventaja es que los resultados predicen la sensibilidad de células de linfoma de pacientes NHL al agente probado (15B8). Sin embargo, los resultados se obtienen de estudio *in vitro* bajo las condiciones definidas. Un estudio publicado previamente reporta que un anti-ratón CD40 de rata, que falla en inducir ADCC y CDD *in vitro*, muestra buena eficacia en dos modelos de linfoma B de ratón singénico (BCL1 y A31) (Tutt A.L., J. Immunol., 1998 Sep. 15, 161(6):3176-85). El efecto anti-tumor en el anti-ratón CD40 ocurre más lento en el tiempo que un anti-Ig probado. El anti-ratón CD40 puede operar al bloquear señales de crecimiento críticas que son dependientes de la expresión de superficie CD40 que no dirige la señalización similar a anti-Ig en los modelos de ratón probados. Este estudio sugiere que el bloque de señalización CD40/CD40L mediante un anti-CD40 puede ser eficaz *in vivo*. Cuando se prueba, el 15B8 no une a los receptores Fcγ *in vitro* y falla en inducir ADCC y CDC *in vitro* debido a que este es de subtipo humano IgG2. El 15B8 es de propiedad similar para el anti-ratón CD40 de rata. Estos datos soportan la hipótesis que el 15B8 será benéfico para pacientes NHL, especialmente pacientes resistentes a Rituxan.

EJEMPLOS

MÉTODOS GENERALES

Ensayo ELISA para Cuantificación de Inmunoglobulina

45 Las concentraciones de IgM y IgG humano se estiman mediante ELISA. Se recubren placas ELISA de 96 pozos con 2 µg/ml de IgG MAb antihumano de cabra (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) o con 2 µg/ml de IgM MAb 4102 antihumano de cabra (BioSource International, Calif.) en 0.05M de amortiguador de carbonato (pH 9.6), mediante incubación durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavan 3 veces con PBS-0.05% de Tween-20 (PBS-Tween) y se saturan con BSA durante 1 hora. Después de 2 lavados las placas se incuban durante 2 horas a 37°C con diferentes diluciones de las muestras de prueba. Después de 3 lavados, el Ig vinculado se detecta mediante incubación durante 2 horas a 37°C con 1 µg/ml de IgG MAb antihumano de cabra marcado con peroxidasa o IgM MAb antihumano de cabra. Las placas se lavan 4 veces y la actividad de peroxidasa vinculada se revela mediante la adición de O-fenilendiamina como un sustrato. Los estándares IgG o IgM humanos (Caltag, Burlingame, CA) se utilizan para establecer una curva estándar para cada ensayo.

Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) de Sangre Periférica Humana.

Se agrega 20ml de solución Ficoll-Paque (endotoxina baja, Pharmacia) por 50 ml de tubo de poliestireno, en 3 tubos, 30 minutos antes de agregar la sangre. La solución Ficoll-Paque se calienta a temperatura ambiente. Se prepara 3L de blanqueador en dilución 1: 10, y se utiliza para lavar todos los tubos y pipetas para poner en contacto la sangre. La sangre se forma en capas en la parte superior de la solución Ficoll-Paque sin hacer turbia la capa Ficoll, a 1.5 ml sangre/1ml de Ficoll-Paque. Los tubos se centrifugan a 1700 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente con el freno de la centrifuga apagado. La mayor parte como sea posible de la capa superior (plasma) se remueve, minimizando el vacío con el fin de evitar remover la segunda capa de la solución. La segunda capa, que contiene los linfocitos B y los linfocitos T, se recolecta utilizando una pipeta Pasteur estéril, y se coloca en dos tubos de 50 ml de poliestireno. La colección se diluye con 3x el volumen de RPMI frío sin aditivos, y los tubos se centrifugan a 1000 RPM durante 10 minutos. El medio se remueve mediante aspiración, y las células de ambos tubos de 50 ml se resuspenden en un total de 10 ml de RPMI frío (con aditivos) y se transfieren a un tubo de 15ml. Las células se cuentan utilizando el hemacitómetro, luego se centrifugan 1000 RPM durante 10 minutos. El medio se remueve y las células se resuspenden en 4 mls de RPMI. Esta fracción contiene ele PBMC.

Aislamiento de las células B de PBMC.

Se colocan 100µml de Dynabeads (anti-hCD19) en un tubo de plástico de 5 ml. Se agrega 3ml de PBS estéril a los glóbulos y se mezcla, y se coloca en el soporte magnético, luego se deja reposar durante 2 minutos. La solución se remueve utilizando una pipeta Pasteur. Se agrega 3mls de PBS estéril, se mezcla y se coloca en el soporte magnético, luego se deja reposar durante 2 minutos. Este procedimiento con PBS estéril se repite una vez más para un total de 3 lavados. El PBMC se agrega a los glóbulos y se incuba, mientras se mezcla, durante 30 minutos a 4°C. El tubo que contiene el PBMC y los glóbulos se coloca dentro del soporte magnético durante 2 minutos, luego la solución se transfiere a un nuevo tubo de 5ml en el soporte magnético. Después de 2 minutos, la solución se transfiere a un nuevo tubo de 15ml. Esta etapa se repite cuatro veces más, y las soluciones de las primeras veces se recolectan en el tubo de 15ml, luego se centrifuga 1000 RPM durante 5 minutos. Esta etapa produce el glóbulo para la separación de célula T.

Se agrega 100ml de RPMI (con aditivos) para recolectar los glóbulos, y la solución se transfiere en un tubo de 0.7ml. Se agregan 10ml de Dynal DetachaBeads en la suspensión a temperatura ambiente, y se le permite rotar durante 45 minutos. La suspensión se transfiere en un nuevo tubo de 5ml y se agrega 3mls de RPMI (con aditivos). El tubo se coloca en el soporte magnético durante 2 minutos. La solución se transfiere en un nuevo tubo de 5ml en el soporte durante 2 minutos, luego a un tubo de 15ml. La etapa previa se repite tres veces más, recolectando la solución en el tubo de 15ml. El tubo de 15ml se centrifuga 1000RPM durante 10 minutos, y las células se resuspenden en 10ml de RMPI. La etapa de lavado se repite 2 más veces para un total de 3 lavados. Las células se cuentan antes de la última centrifugación. Esta etapa completa la purificación de célula B. Las células se almacenan en 90% de FCS y 10% de DMSO y se congelan a - 80°C.

Aislamiento de las células T.

La Columna de Enriquecimiento de Célula T humana (R&D systems, equipo de columna anti-hCD3) se prepara utilizando 20ml de amortiguador de lavado de columna 1X al mezclar 2ml de amortiguador de lavado de columna 10X y 18ml de agua destilada estéril. La columna se limpia con 70% de etanol y se coloca en la parte superior de un tubo de 15 ml. La tapa de la parte superior de la columna primero se remueve para evitar correr al aire en el fondo de la columna. Luego, la tapa del fondo se remueve, y la punta se limpia con 70% de etanol. El fluido dentro de la columna se le permite drenar en el tubo de 15ml. Se coloca un nuevo tubo de 15ml estéril bajo la columna después que el amortiguador de columna ha drenado hasta el nivel del filtro blanco. La célula B que agota la fracción de PBMC se suspende en 1ml de amortiguador y se agrega a la parte superior la columna. Las células se les permiten incubar con la columna a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células T se eluyen de la columna con 4 alícuotas de 2ml de cada amortiguador de lacado de columna 1X. Las células T recolectadas se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se remueve y las células se resuspenden en 10mls de RPMI. Las células se cuentan y se centrifugan una vez más. El sobrenadante se remueve, completando la purificación de célula T. Las células se almacenan en 90% de FCS y 10% de DMSO y se congelan a -80°C.

Para los procedimientos anteriores, la composición de RPMI contiene 10 % de FCS (inactivado a 56°C durante 45 min.), 1% de Pen/Strep (100u/ml de Penicilina, 0.1mg/ml de estreptomina), 1% de Glutamato, 1% de puravato de sodio, 50mM de 2-ME.

Ensayo Citofluorométrico de Flujo

Las células ramos (10^6 células/muestra) se incuban en 100 μ l de anticuerpo primario (10 μ g/ml en PBS-BSA) durante 20 min a 4°C. Después de 3 lavados con PBS-BSA o HBSS-BSA, las células se incuban en 100 μ l de fragmento F(ab')₂ marcado FITC de anticuerpos anti-(IgG humano) de cabra (Caltag) durante 20 min a 4°C. Después de 3 lavados con PBS-BSA y 1 lavado con PBS, las células se resuspenden en 0.5 ml de PBS. Se desarrollan análisis con un FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, Calif.).

Generación de Clones de Hibridoma

Los esplenocitos de ratones inmunizados se utilizan con SP2/0 o P3 x 63Ag8.653 de células de mieloma de murino en una relación de 10:1 utilizando 50% de polietilenglicol como se describió previamente por de Boer et al., J Immunol. Meth. 113:143 (1988). Las células fusionadas se resuspenden en medio completo IMDM complementado con hipoxantina (0.1 mM), aminopterina (0.01 mM), timidina (0.016 mM) y 0.5 ng/ml de hIL-6 (Genzima, Cambridge, Mass.). Las células fusionadas luego se distribuyen entre los pozos de placas de cultivo de tejido de 96 pozos, ya que cada pozo contiene 1 crecimiento de hibridoma en promedio.

Después de 10-14 días los sobrenadantes de las poblaciones de hibridoma se detectan para la producción de anticuerpo específica. Para la detección de la producción de anticuerpo específica mediante los clones de hibridoma, los sobrenadantes para cada pozo se agrupan y se prueban para la especificidad de actividad anti-CD40 especificidad mediante ELISA primero. Los positivos luego se utilizan para tñido celular fluorescente de células B transformadas EBV como se describe para el Ensayo FACS anterior. Las células de hibridoma positivas se clonan dos veces al limitar la dilución en IMDM/FBS que contiene 0.5 ng/ml de hIL-6.

EJEMPLO 1

EXPRESIÓN DE CD40 HUMANO EN CÉLULAS SF9

Las células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus del virus recombinante Autographa californica (AcNPV), que codifican CD40, se cultivan durante 48 horas en placas de 24 pozos. Después de la remoción del medio de cultivo de tejido las placas se incuban durante 45 minutos a temperatura ambiente (TA) con 0.25 ml de anticuerpo en PBS con 1% BSA (PBS-BSA). Después de tres lavados con PBS-BSA, las placas se incuban durante 35 minutos a TA con 250 μ l de una dilución 1/250 de inmunoglobulinas anti-(ratón Ig total) de cabra conjugadas con peroxidasa de rábano (Zymed, Sur de San Francisco, Calif.) en PBS-BSA. La actividad de peroxidasa no vinculada se remueve al lavar cinco veces con PBS-BSA. La actividad de peroxidasa vinculada se revela mediante la adición de una mezcla de ensayo se prepara al diluir 0.5 ml de 2 μ g/ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en etanol a 10 ml con 10 mM de acetato de sodio, 10 mM de amortiguador EDTA (pH 5.0) y agregar 0.03% (v/v) H₂O₂. La reacción se detiene después de 10 minutos al agregar 100 μ l de 1 M H₂SO₄.

EJEMPLO 2

35 ANTICUERPOS ELEVADOS EN RATONES TRANSGÉNICOS DE INMUNOGLOBULINA HUMANA

Los ratones transgénicos para el locus de cadena pesada humana IgG2 y el locus de cadena liviana humana K se inmunizan con células Sf9 que expresan CD40 humano. El método de inmunización se lleva a cabo como se describe por de Boer, Patente Estadounidense No. 6,004,552. En resumen, los ratones se inyectan intraperitonealmente en el día 0 y el día 14 con 5 x 10⁶ células Sf9 infectadas con el virus AcCD40. En el día 21, se obtiene 100 μ l de suero para probar la presencia de anticuerpos específicos. Después del resto del periodo de por lo menos dos semanas, los ratones reciben una inyección final con 5 x 10⁶ células infectadas con el virus AcCD40. Tres días después de esta última inyección, las células del bazo se utilizan para fusión celular.

Los ratones se seleccionan para fusión con base en la reactividad de su suero con CD40 recombinante en un ELISA. Las células de bazo de los ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma de ratón (NS/0) mediante el método de Kohler and Milstein, Nature 256:495-96 (1975), con modificaciones. Los hibridomas que crecen en medios selectivos HAT se seleccionan para caracterización adicional con base en su capacidad de unir CD40 en un ELISA. Los hibridomas que producen anticuerpos del lisato celular Sf9 no transfectedo vinculado o el anticuerpo de cadena liviana anti-ratón se retiran de consideración. Se subclonan los hibridomas que producen los anticuerpos de unión CD40 que unen al lisato celular Sf9 o el anticuerpo de cadena liviana anti-ratón. Los subclones se utilizan para producir anticuerpos para

caracterización adicional. Los anticuerpos de hibridoma también se prueban por su capacidad de teñir células de linfoma Ramos, que expresan CD40 humano en sus superficies. La concentración de anticuerpos da unión CD40 media- máxima cuando se mide mediante ELISA se muestra adelante en la Tabla 2.

Tabla 2 Concentración de anticuerpo anti-CD40 que da unión CD40 media-máxima mediante ELISA

Anticuerpo	EC50 (ng/ml)
5H7	10
12D9	15
15B8	40
20C4	15
9F7	15

5

Los anticuerpos de hibridoma luego se seleccionan por su capacidad de inhibir la producción de IgM mediante células B sanguíneas periféricas humanas estimuladas con células T de sangre periférica humana activada por anti-CD28 (Figura 1). Se detectan adicionalmente anticuerpos de hibridoma por su capacidad de inhibir la proliferación de células B sanguíneas periféricas humanas inducidas por CD40L y anti-IgM (Figura 2). También se detectan hibridomas por su capacidad de inducir la proliferación en las células B sanguíneas periféricas humanas restantes (Figura 3). Algunos hibridomas, tal como 36C4-G2, exhiben actividad estimuladora marcada. Así, aún cuando es capaz de unir CD40, no todos los anticuerpos humanos exhiben el efecto inhibitor deseado. Se seleccionan cuatro hibridomas de aproximadamente 36 que tienen la actividad inhibitora óptima.

15 EJEMPLO 3

PROPIEDADES DE UNIÓN DE HIBRIDOMAS SELECCIONADOS

Se seleccionan cuatro hibridomas con base en su efecto inhibitor en la activación de célula B como se describió anteriormente en el Ejemplo 2. Se determinan sus propiedades de unión mediante evaluación BIAcore utilizando CD 40 soluble recombinante como la fase móvil con los anticuerpos anti-CD40 que se capturan en la superficie sensora. Los anticuerpos inhibidores exhiben varias afinidades de unión, que son adecuados para los usos descritos aquí, como se muestra en la Tabla 3.

20

Tabla 3

Anticuerpo	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd (sec ⁻¹)	KD (M)
5H7 F _{ab} *	2.4 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁻³	1.4 x 10 ⁻⁹
5H7 Ab**	1.5 x 10 ⁶	4.1 x 10 ⁻³	2.8 x 10 ⁻⁹
15B8**	1.16 x 10 ⁶	3.6 x 10 ⁻³	3.1 x 10 ⁻⁹
20C4**	1.9 x 10 ⁵	3.6 x 10 ⁻²	1.8 x 10 ⁻⁷
12D9**	1.5 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁻¹	6.7 x 10 ⁻⁷
9F7**	1.35 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁻²	1.7 x 10 ⁻⁷
*Fase fija= CD40, Fase móvil = F _{ab}			
**Fase fija= anticuerpo, Fase móvil = sCD40			

EJEMPLO 4

HIBRIDOMA VARIABLE UNIDO A CD40

25

Las propiedades de unión relativa de los anticuerpos monoclonales seleccionados se examinan mediante citometría de flujo. La sangre completa se incubó durante 30 minutos con varias concentraciones de anticuerpo hibridoma no marcado más 0.1 mg de conjugado FITC 15B8 y anti-CD20-PECy5. Luego se lisan los RBC, las poblaciones de leucocito fijo, y las preparaciones adquiridas para análisis.

30

Estos estudios muestran que el 15B8 bloquea la unión de linfocitos 20C4 a CD20+ no marcados de sangre periférica humana (Tabla 4). En contraste, el 20C4 no marcado solo bloque débilmente la unión de 15B8 marcado en la misma población celular. Así, aunque los anticuerpos reconocen los mismos epítomos o los epítomos cercanamente asociados, la diferencia en la afinidad que se muestra en el análisis Biacore también se refleja en la capacidad competitiva más débil del anticuerpo de afinidad inferior. Los MAb marcados se utilizan para teñir células sanguíneas periféricas de humanos, macaco de la india (*Macaca mulatta*), y macacos de Java (*Macaca fascicularis*). Todas las tres especies se tiñen mediante MAb 15B8, 20C4, 12D9, y 9F7 (Figura 7).

35

Tabla 4

Tubo #	Anticuerpo-1	μg	Anticuerpo-2	μg	huWB #1219	MFI*	% de reducción MFI
1	-	-	15B6-FITC	0.1	100 μl	72.0	
2	HulgG2	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	117.5	-63.19%
3	HulgG2	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	97.0	-34.72%
4	HulgG2	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	103.8	-44.17%
5	15B8	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	22.0	69.44%
6	15B8	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	20.5	71.53%
7	15B8	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	25.9	64.03
8	20C4	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	91.6	-27.22%
9	20C4	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	70.3	2.36%
10	20C4	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	61.0	15.28%
11	-	-	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.3	
12	HulgG2	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.6	-0.61%
13	HulgG2	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	74.4	9.60%
14	HulgG2	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.4	-0.12%
15	15B8	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	18.3	77.76%
16	15B8	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	21.3	74.12%
17	15B8	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	22.3	72.90%
18	20C4	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	30.2	63.30%
19	20C4	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	22.6	72.54%
20	20C4	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	20.8	74.73%

*MFI: Intensidad de fluorescencia media

EJEMPLO 5

5 INHIBICIÓN DE SECRECIÓN DE INMUNOGLOBULINA MEDIANTE CÉLULAS B PERIFÉRICAS HUMANAS

Las placas se recubren con CD3 anti-humano (2mg/ml, UCHT1, NE/LE, Pharmingen), a 4°C durante noche. Las placas precubiertas se lavan 3 x con PBS. Las células T se irradian con 3000 Rad. Las células B se resuspenden en RPMI(+) a 10^4 por ml. Se agregan 100ml de células B en el pozo, luego se agregan anticuerpos anti-CD40 en el pozo. Las células T se resuspenden en RPMI(+) a 10^5 por ml. Se agrega IL2 recombinante humano para 200u/ml (Chiron, 10u/ ml de solución de agua almacenada a -20°C) en la suspensión celular. Una suspensión de 100ml se toma en cada pozo, y el pozo se mezcla con las células B y los anticuerpos. Se agrega RPMI(+) a los pozos para un total de 200ml. Las placas se incuban a 37°C durante 8 días antes de cosechar el medio, después de centrifugar las células para ELISA. Los resultados se muestran en adelante en la Tabla 5.

15

Tabla 5

Efecto de anticuerpos monoclonales en secreción IgM mediante células B estimuladas por célula T	
Anticuerpo	O.D.
Ninguno	0.67
15B8	0.35
20C4	0.43
12D9	0.47
13E4	0.37

Los resultados muestran que en la presencia de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se reduce la secreción de inmunoglobulina, IgM, mediante células B sanguíneas periféricas humanas estimuladas por células T.

EJEMPLO 6

INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B PERIFÉRICAS HUMANAS ESTIMULADAS POR JURKAT

5 Se purifican células B como se describió anteriormente. 10^4 células B purificadas, 10^5 células Jurkat irradiadas (3000 Rad), y los anticuerpos a ser probados se agregan en una placa de 96 pozos recubierta con anti-CD3. Las placas se incuban a 37°C durante cuatro días, con marca de las células con ^3H -timidina durante las últimas 18 horas. Las células se cosechan y se cuentan. Los resultados se muestran adelante en la Tabla 6.

Tabla 6

Efecto de anticuerpos en proliferación de células B estimuladas por células Jurkat	
Anticuerpo	Conteos por minuto (cpm)
Ninguno	14,000
5H7, 10 $\mu\text{g/ml}$	8,000
5H7, 0.1 $\mu\text{g/ml}$	9,000
15B8, 1 $\mu\text{g/ml}$	10,500
13E4, 1 $\mu\text{g/ml}$	11,000
20C4, 1 $\mu\text{g/ml}$	10,500

10

Los resultados indican que en la presencia de los anticuerpos de la invención, se inhibe la proliferación de células B estimuladas por células Jurkat.

EJEMPLO 7

15 INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B PERIFÉRICAS HUMANAS ESTIMULADAS POR CD40L

Se purifican células B como se describió anteriormente. 10^4 células B purificadas, 2×10^4 células CHO-CD40L fijas con formaldehído, y los anticuerpos a ser probados se agregan en placas de 96 pozos recubiertas con anti-CD3. Las placas se incuban a 37°C durante cuatro días, con marca de las células con ^3H -timidina durante las últimas 18 horas. Las células se cosechan y se cuentan. Los resultados se muestran adelante en la figura 1.

20

EJEMPLO 8

SIMULACIÓN DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B

25 Las células B (1×10^4 por pozo) se cultivan en 200 ml de RPMI complementado con 10% de suero de becerro fetal en placas de microtítulo de 96 pozos de fondo en U. Las células B se estimulan mediante la adición de anticuerpos anti-(IgM) inmobilizados (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma). Las varias concentraciones de los MAb se agregan al inicio de los microcultivos y se evalúa la proliferación en el día 4 mediante la medición de la incorporación de ^3H -timidina después de 18 hora de pulso. Los resultados se muestran en la figura 2.

EJEMPLO 9

30 EFECTO DE ANTICUERPOS ANTI-CD40 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B PERIFÉRICAS HUMANAS ESTIMULADAS POR ANTI-IGM

35 Se agregan 10^4 células B purificadas, glóbulos anti-IgM (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma), y los anticuerpos a ser probados en placas de 96 pozos. Las placas se incuban a 37°C durante cuatro días, con marca de las células con ^3H -timidina durante las últimas 18 horas. Las células se cosechan y se cuentan, y los resultados se muestran en la figura 3.

EJEMPLO 10

EFECTO DE ANTICUERPO ANTI-CD40 RETICULADO EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B PERIFÉRICAS HUMANAS

5 Se agregan 10^4 células B purificadas en placas de 96 pozos recubiertas con anti-CD40. Las placas se incuban a 37°C durante cuatro días, con la marca de las células con ^3H -timidina durante las últimas 18 horas. Las células se cosechan y se cuentan, y los resultados se muestran en la figura 4.

EJEMPLO 11

SECUENCIAS DE POLINUCLEÓTIDO Y SECUENCIAS DE AMINOÁCIDO DE ANTICUERPOS HUMANOS ANTI-CD40

10 Se prepara mRNA de los hibridomas generados como se describe en el Ejemplo 2 y se desarrolla RT-PCR en los mRNA. Se utilizan dos conjuntos de cebadores para generar productos PCR: un universo o grupo de cebadores de la familia de cadena liviana o pesada; y luego cebadores específicos de familia. Los productos PCR se analizan en geles, se secuencian, y se trasladan. Las secuencias de polinucleótido y las secuencias de aminoácido se proporcionan en el Listado de Secuencias como se resume en la Tabla 7.

15

Tabla 7

SEQ ID NO:	Anticuerpo	Región
1	12D9	Polinucleótido de región constante de cadena pesada
2	12D9	Aminoácidos de región de cadena pesada
3	20C4	polinucleótido VK1
4	20C4	polinucleótido VH1
5	9F7	polinucleótido VK1
6	9F7	polinucleótido VH1
7	15B8	polinucleótido VK3
8	15B8	polinucleótido VH1
9	13E4	polinucleótido VH1
10	12D9	polinucleótido VH1
11	9F7	aminoácidos VH1
12	12D9	aminoácidos VH1
13	15B8	aminoácidos VH1
14	20C4	aminoácidos VH1
15	9F7	aminoácidos VK1
16	12D9	aminoácidos VK1
17	15B8	aminoácidos VK1
18	20C4	aminoácidos VK1

Las regiones específicas de los anticuerpos se muestran en las Figuras 5, 6, y 8-14. Esta información se puede utilizar para diseñar anticuerpos monoclonales adicionales para uso de acuerdo con la invención. Estos anticuerpos monoclonales pueden diferir de aquellos descritos aquí, mediante la sustitución de una o más de las estructuras o regiones CDR. Los anticuerpos monoclonales también pueden diferir mediante la sustitución de uno o más aminoácidos, que se muestran por diferir en ciertas regiones de la estructura y CDR (Figuras 5 y 6). Una vez se diseña la secuencia de aminoácido, se pueden utilizar procedimientos de rutina para construir una secuencia de polinucleótido correspondiente para la expresión del anticuerpo monoclonal. La expresión y purificación de los anticuerpos monoclonales se desarrolla utilizando los métodos conocidos en la técnica, tal como aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,545,403, 5,545,405, y 5,998,144, que se incorporan aquí como referencia.

EJEMPLO 12

EFECTO DE 15B8 EN PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS B MALIGNAS EN *IN VITRO*

30 Para probar si el 15B8 proporciona la señal de crecimiento como CD40L *in vitro*, las células B de nodos linfáticos infiltrados de tumor (células NHL) se obtienen de un anticuerpo no tratado, un paciente NHL resistente a rituximab y uno sensible a rituximab. Las células NHL se estudian bajo cuatro diferentes

condiciones de cultivo; no se agrega anticuerpo (medio); la adición del anticuerpo de isotipo IgG2 humano (control); la adición del anticuerpo anti-CD40 MS81 (anticuerpo agonístico); y la adición de 15B8. Se prueban todos los anticuerpos 1, 2, y 5 µg/ml en la presencia o ausencia de IL-4. Las células NHL de dos pacientes se cultivan como se describió anteriormente bajo las mismas cuatro condiciones en la presencia de IL-4 (2 ng/ml). Se mide la proliferación de células B mediante incorporación de ³H-timidina como se describió anteriormente.

El anticuerpo anti-CD40 15B8, en la concentración de 1, 2 y 5 µg/ml, no estimula las células NHL para proliferar en la presencia o ausencia de IL-4. En contraste, un anticuerpo agonístico anti-CD40 (MS81), probado en la misma concentración, estimula la proliferación de célula NHL o en la presencia y ausencia de IL-4 en todas las muestras de pacientes. Los resultados representativos de un paciente se muestran adelante (Figura 15 y Figura 16). Son comparables los resultados de las células NHL de los dos pacientes en la presencia de IL-4 y tres pacientes en ausencia de IL-4. Estos resultados indican que el 15B8 no es un anticuerpo agonista anti-CD40 y no estimula la proliferación de las células NHL de pacientes NHL resistentes a, sensibles a rituximab o no tratados *in vitro*.

El análisis FACS de las células NHL se desarrolla con un 15B8-FITC o 15B8 de marca directa más anti-HulG2-FITC para confirmar que el CD40 se expresa en la superficie de las células NHL probadas y que el 15B8 se une a las células NHL. Se prueban las células NHL de los dos pacientes sensibles a rituximab y los cuatro pacientes resistentes a rituximab (6 pacientes en total). Las células NHL de todos los pacientes expresan CD40 y se vinculan a 15B8. La población celular positiva de unión 15B8 en cualquier paciente dado es aproximadamente 66% a 91 %.

EJEMPLO 13

EL 15B8 INHIBE LA PROLIFERACIÓN ESTIMULADA POR CD40L DE CÉLULAS NHL *IN VITRO*

Para evaluar la capacidad del 15B8 para bloquear la señal de crecimiento proporcionada por CD40L *in vitro*, las células NHL de los pacientes se cultivan como se describe en el Ejemplo 12 en la suspensión sobre células alimentadoras que expresan CD40L bajo cuatro diferentes condiciones: no se agrega anticuerpo (medio); la adición del anticuerpo de isotipo IgG2 humano (control); la adición del anticuerpo anti-CD40 MS81 (anticuerpo agonístico); y la adición de 15B8. Se agregan todos los anticuerpos en concentración de 1, 2, y 5 µg/ml en la presencia la ausencia de IL-4. Las células NHL de un anticuerpo no tratado, dos pacientes sensibles a rituximab y cinco pacientes resistentes a rituximab (8 pacientes en total) se cultivan bajo las mismas cuatro condiciones como se describió anteriormente en la presencia de IL-4 (2 ng/ml). Las células NHL de tres pacientes sensibles a rituximab y cuatro pacientes resistentes a rituximab (7 pacientes en total) se cultivan bajo condiciones similares en la ausencia de IL-4. La proliferación celular NHL se mide mediante incorporación de ³H-timidina.

La Tabla 8 adelante muestra el efecto inhibitor de 15B8 en la proliferación de las células NHL de dos pacientes sensibles a rituximab (datos reproducibles de un paciente en dos experimentos separados) y cuatro pacientes resistentes a rituximab (6 pacientes en total) estimulados por CD40L solo *in vitro*. Se muestran los resultados representativos de las células de un paciente (A) (Figura 17). El 15B8 inhibe la proliferación mediante aproximadamente 12-68% cuando se compara con el control en los seis pacientes. El grado de inhibición mediante 15B8 varía dependiendo de las muestras del paciente y el nivel de dosis de 15B8. El análisis estadístico de los datos de seis de las siete muestras de paciente probadas muestra que la inhibición de la proliferación celular NHL estimulada por CD40L mediante 15B8 es significativa a 1 µg/ml ($p=0.05$). Existe una respuesta de dosis estadísticamente significativa ($p<0.005$), el efecto inhibitor se incrementa cuando se incrementa la dosis de 15B8.

Tabla 8

Efecto de 15B8 Mab en Proliferación estimulada por CD40-L de Células de Pacientes NHL en la Ausencia de IL-4 ¹			
ID del paciente	Paciente tipo ²	Dosis de tratamiento (ug/ml)	15B8 % de Inhibi. ³
A	CR	1	56.61
		2	58.99
		5	63.16
A	CR	1	61.96
		2	60.41
		5	64.75
		10	60.29
B	CR	1	Ninguno
		2	Ninguno
		5	Ninguno
		10	12.11
D	NR	1	52.22
		2	61.63
		5	68.04
		10	68.17
E	NR	1	13.07
		2	22.34
		5	31.04
		10	31.87
F	NR	1	24.51
		2	27.43
		5	38.71
		10	47.35
G	NR	1	11.12
		2	22.41
		5	30.61
		10	43.15

1. Las células NHL de los pacientes se cultivan con células L de murino que expresan CD40L humano en la presencia del medio, isotipo de control anti-CD40 agonista (MS81), anti-CD40 antagonista (15B8) o huIgG2 *in vitro*. La proliferación de las células NHL se mide mediante la incorporación de ³H-timidina (datos de un paciente sensible a rituximab no está en la tabla para el cpm de CD40L es <2000).

2. La respuesta del paciente a terapia anti-CD20 Mab; CR, respondedor completo; NR, no respondedor

3. 15B8 % de inhibición=100 - (15B8 cpm/huIgG2cpm x 100); representa la media de 3 determinaciones

La Tabla 9 (adelante) muestra el efecto inhibitor de 15B8 en la proliferación de las células NHL de un anticuerpo no tratado, dos muestras sensibles a rituximab (datos de ambas muestras de pacientes se repiten dos veces reproduciblemente) y cinco pacientes resistentes a rituximab (8 pacientes en total) estimulados por CD40L y IL-4 *in vitro*. A 1 µg/ml, el 15B8 inhibe significativamente (p<0.05) el CD40L y la proliferación mediada por IL-4 de las células NHL. El grado de inhibición varía de 18-69% en dosis alta (5 o 10 µg/ml) en muestras de todos los 8 pacientes *in vitro*. Existe una respuesta de dosis estadísticamente significativa de este efecto inhibitor mediante 15B8 (p<0.005) (la Figura 18 muestra una curva de respuesta de dosis representativa) en el rango de concentración de 15B8 de 0.01 - 10 µg/ml.

Estos resultados *in vitro* sugieren que el tratamiento con 15B8 puede bloquear la señal de crecimiento mediada por CD40 para las células NHL en pacientes.

Tabla 9

<u>Efecto de 15B8 Mab en Estimulación de CD40-L de Células de Pacientes NHL en la Presencia de IL-4¹</u>			
A	CR	1	34.39
		2	30.54
		5	36.42
A	CR	0.01	0.44
		0.04	23.32
		0.2	29.54
		1	35.38
		5	46.12
C	CR	10	48.63
		1	34.91
		2	40.89
C	CR	5	56.34
		10	69.21
		1	Ninguno
C	CR	2	16.79
		5	21.64
		10	12.63
D	NR	1	1.95
		2	6.43
		5	20.95
E	NR	10	26.31
		1	1.91
		2	2.74
E	NR	5	28.36
		10	28.26
		1	Ninguno
F	NR	2	11.76
		5	27.54
		10	34.07
G	NR	1	39.38
		2	32.74
		5	36.48
G	NR	10	37.78
		1	Ninguno
		2	Ninguno
H	NR	5	7.81
		10	18.47
		0.01	Ninguno
I	Naïve	0.04	13.16
		0.2	15.64
		1	16.20
		5	21.53
		10	24.51

1. Las células NHL de los pacientes se cultivan con células L de murino que expresan CD40L humano en la presencia de IL-4 (interleuquina-4 humana) en 2 ng/ml bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.

2. La respuesta del paciente a terapia anti-CD20 Mab; CR, respondedor completo; NR, no respondedor; Naïve, no tratado

3. % de inhibición comparado con hlgG2, 15B8% de inhibición=100- (15B8 cpm/hulgG2cpmx 100);

EJEMPLO 14

DEMOSTRACIÓN DE ACTIVIDAD AGONÍSTICA Y ANTAGÓNICA DE 15B8 EN DIFERENTES ESPECIES *IN VITRO*

5 Para determinar si este es un anti-CD40 agonista o antagonista, se prueba el 15B8 en varios ensayos *in vitro* adelante utilizando las células de humanos y cinco diferentes especies de primate, que incluyen chimpancé (chimpancé), tití, mono cinomologus, mono rhesus y babuino.

10 El 15B8 no activa la célula B de sangre periférica humana y no origina proliferación de PBMC *in Vitro* en humanos, chimpancés y tití. La activación de CD40 en las células B humanas obtenidas de sangre periférica que conduce a la proliferación de las células B (van Kooten C., J. Leukoc. Biol., 2000 Jan., 67(1):2-17; Denton M.D., *Pediatr. Transplant.*, 1998 Feb., 2(1):6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164(2):688-97; Noelle R.J., *Agents Actions Suppl.*, 1998, 49:17-22; Lederman S. et al., *Curr. Opin. Hematol.*, 1996, 3(1):77-86). Para probar si el 15B8 activa CD40 en células B, una serie de ensayos de proliferación se lleva a cabo utilizando células B humanas frescamente aisladas o PBMC de sangre periférica. El efecto de 15B8 en este ensayo se mide por la incorporación de ³H metil-timidina (John E. Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Vol. 13:12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., *Immunology*, 1993 Jul, 79(3):439-444). Como se muestra en la Tabla 10 adelante en concentraciones de 0.2, 1 y 5 µg/ml, el 15B8 tiene efecto mínimo en la proliferación de célula B purificada comparado con el efecto en CD40L, que demuestra el efecto de promover la proliferación fuerte en células B humanas. Como se muestra en la tabla 3, son comparables los resultados en las células B purificadas de dos voluntarios saludables.

20 El 15B8 se compara adicionalmente con CD40L para la estimulación de la proliferación de PBMC humana utilizando PBMC humano frescamente aislado. Como se resume en la Tabla 10 adelante, el 15B8 no estimula la proliferación de PBMC humana *in vitro* según se mide por la incorporación de 3-H metil-timidina (John E. Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Vol. 13:12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., *Immunology*, 1993 Jul, 79(3):439-444) en las muestras probadas de dieciséis voluntarios en el rango de concentración de 0.2-5mg/ml.

Tabla 10

Estimulación de proliferación de células PBMC/B en humanos, chimpancés y tití mediante anticuerpo 15B8 ¹						
Especies	Fuente celular	Número de muestras	Dosis (ug/ml)	hlgG2, base	CD40L, veces de incremento ³	15B8, veces de incremento ²
Humano	B	2	5	1	70.58/36.33	1.77/4.37
		2	1	1	70.58/36.33	3.1/5.4
		2	0.2	1	70.58/36.33	1.16/4.63
Humano	PBMC	5	5	1	9.36-91.60	0.40-2.28
		15	1	1	9.36-91.60	0.35-2.38
		12	0,2	1	9.36-91.60	0,41-3.74
Mono tití	PBMC	3	5	1	29.24-90.3	2.05-7.2
		5	1	1	7.99-90.3	1.35-5.79
Chimpancé PBMC	PBMC	1	5	1	10.15	2.46
		5	1	1	5.12-9.2	0.66-5.2

1. Las células B/PBMC se cultivan *in vitro* en la presencia de control de isotipo CD40L, 15B8 o hulgG2.
 2. Resultados de proliferación celular se reportan como la relación de incorporación de ³H-timidina durante controles 15B8 a hulgG2. Los datos de algunas muestras no se incluyen en la tabla para el CPM inducido por CD40L (control positivo) <2000.
 3. El incremento en veces para CD40L mostrado en la tabla es la relación del CD40L cpm al cpm de hulgG2 a 5mg/ml. Las células CHO transfectadas CD40L: CD40L, se fijan con formaldehído antes de los experimentos.

Luego de la activación de célula B, un número de proteínas de superficie celular se sobregulan (Denton M.D., *Pediatr. Transplant.*, 1998 Feb., 2(1):6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164(2):688-97;

Noelle R.J., Agents Actions Suppl., 1998, 49:17-22; Lederman S. et al., Curr. Opin. Hematol., 1996, 3(1):77-86). Para confirmar que el 15B8 no activa las células B humanas y no induce una señal agonista cuando se vincula a CD40, su capacidad de sobrerregular los marcadores de activación de célula B se prueban mediante análisis FACS utilizando PBMC humano purificado. No existe sobrerregulación en la expresión de marcadores de activación tal como CD25, CD69, CD86, HLA-DR y ICAM-1 (CD54) en células B humanas tratadas 15B8 B (Tabla 4). El nivel de estos marcadores es similar cuando las células se tratan con el control 15B8 o hulG2 (Tabla 11). En contraste, el CD69 se sobrerregula consistentemente mediante CD40L en muestras de PBMC de tres voluntarios saludables probados.

Tabla 11

Efecto de 15B8 en sobrerregulación de marcadores de activación de célula B in Vitro mediante FACS									
Especies	Fuente celular	Tiempo de incubación	Número de sujeto	CD54	CD69	HLA-DR	CD25	CD80	CD86
Humano	CD20 de PBMC	4h-24h	3	-	-	-	-	N/A	-
Chimpancé	CD20 de PBMC	4h-24h	3	NA	-	N/A	N/A	N/A	N/A

1. "-" significa sin sobrerregulación
2. "N/A" significa no medido o no exitoso

10

Las consecuencias adicionales de la activación de célula B son la sobrerregulación de FasL de superficie y apoptosis (Revy P., Eur. J Immunol., 1998 Nov., 28(11):3648-3654; Carey G.B., Immunol. Rev., 2000 Aug., 176:105-115; Ju S.T., Int. Rev. Immunol., 1999, 18(5-6):485-513; Baumgarth N., Immunol. Rev., 2000 Aug., 176:171-180). Para confirmar que el 15B8 no es un anticuerpo anti-CD40 agonístico, su capacidad de inducir la expresión de FasL y apoptosis de células B humanas también se prueba. El teñido con anexina V en la superficie celular se puede utilizar como un marcador de apoptosis temprano (Ju S.T., Int. Rev. Immunol., 1999, 18 (5-6):485-513). Se purifican células B humanas de sangre periférica y se incuban con 15B8. El análisis FACS se utiliza para detectar las células con teñido positivo de anexina V y anti-FasL. No existe diferencia significativa en el teñido de superficie mediante los dos reactivos entre las células que se incuban con 15B8 o el anticuerpo de control de isotipo (hulG2). Este resultado muestra que 15B8 no induce la apoptosis de células B humanas *in vitro*. Estos datos proporcionan evidencia adicional que el 15B8 no es un anticuerpo anti-CD40 agonístico para las células B humanas.

El 15B8 reacciona cruzado con CD40 expresado en la superficie de PBMC positivos CD20 de primates. Para probar si el 15B8 puede activar el CD40 en las células B de otras especies de primates tal como chimpancés y titís, el mismo ensayo de proliferación se lleva a cabo utilizando PBMC de quince chimpancés y cinco titís frescamente aislado. Similar a los resultados con el PBMC humano, el 15B8 no estimula la proliferación *in vitro* de los PBMC de seis chimpancés y cinco titís a 1 y concentración de 5 µg/ml (Tabla 3 anterior). El 15B8 tampoco sobrerregula la expresión del marcador de activación, CD69, en las tres muestras probadas PBMC de chimpancé (Tabla 4). El 15B8

no muestra ningún efecto en la expresión de FasL y apoptosis en PBMC de chimpancé similar a controles humanos PBMC después de 24 y 48 horas de simulación *in vitro* en todas las muestras de los seis chimpancés probados.

El 15B8 reticulado mediante un anticuerpo secundario fijado a una superficie de plástico no incrementa su potencia para estimular la proliferación de células B (datos no mostrados). Cuando se prueba utilizando los PBMC de humanos y chimpancés en este ensayo de reticulación, el 15B8 no estimula la proliferación de las células. Esta observación indica un riesgo reducido de 15B8 que es estimulador (agonístico) para la proliferación de células B en el caso de la inducción de anti-15B8 (HAHA) o Fc unido a otro receptor Fc que expresa las células cuando se administran *in vivo*.

En resumen, el 15B8 no inicia una señal de activación en células B/PBMC humanas ni en PBMS de chimpancé/tití *in vitro*. Por lo tanto, el 15B8 no es un anticuerpo anti-CD40 agonístico en humanos, chimpancés y titís.

EJEMPLO 15

EL 15B8 ES UN ANTICUERPO ANTI-CD40 ANTAGONISTA EN HUMANOS, CHIMPANCÉS Y TITÍS *IN VITRO*.

5 Para determinar si el 15B8 es un anti-CD40 antagonista, su capacidad de inhibir la interacción de CD40-CD40L se prueba en un ensayo de proliferación de célula B humana mediada por CD40L (Kwekkeboom J., Immunology, 1993 Jul, 79(3):439-444). Una estirpe celular CHO transfectada que expresa CD40L humano se utiliza para estimular la proliferación de células B sanguíneas periféricas humanas purificadas o PBMC. Se prueban las células B humanas de diez voluntarios saludables y los PBMC humanos de tres voluntarios saludables. En todas las muestras probadas, el 15B8 suprime la proliferación medida por células CHO que expresan CD40L mediante 42-88% en el rango de concentración de 0.2 - 5mg/ml (Tabla 12). La figura 19 muestra las curvas de respuesta de dosis representativas utilizando las células de tres individuos. La dosis sin efecto de 15B8 es 0.008 µg/ml y alcanza la dosis saturada a 0.2 µg/ml (Figura 19). Esta observación indica que el 15B8, como un anticuerpo anti-CD40 antagonista, puede inhibir las señales de crecimiento en células B humanas y PBMC proporcionadas por CD40L que expresa la superficie celular.

Tabla 12

Inhibición de proliferación inducida por CD40L de célula PBMCB con el anticuerpo 15B8 ¹						
Especies	Fuente celular	Número de muestras	Dosis (ug/ml)	CD40L (base)	hlgG2, % de inhibición	15B8, veces de inhibición 2
Humano	B	7	5	100	(-27)-14%	45-85%
		9	1	100	(-93)-11%	42-87%
		6	0.2	100	(-20)-(-6)%	44-82%
Humano	PBMC	1	5	100	13%	45%
		2	1	100	3-32%	76-88%
Mono tití	PBMC	3	1	100	1-35%	68-84%
PBMC de chimpancé	PBMC	3	1	100	(-3)-21%	55-73%

1. Las células B/PBMC se cultivan in Vitro con CD40L que expresa células CHO en presencia de control de 15B8 or hulgG2. El CD40 que transfecta células CHO se fijan con formaldehído antes de los experimentos. La proliferación de las células se mide mediante la incorporación de 3H-timidina.
 2. "15B8 % de inhibición" = 100 (15B8 cpm/CD40L cpm x 100) Los datos de algunas muestras que no están en la tabla para la proliferación inducida por CD40L (control positivo) está en menos veces.

Se llevan a cabo ensayos adicionales utilizando PBMC frescamente aislados de nueve chimpancés y tres titís. Como con los PBMC humanos, el 15B8 es capaz de inhibir la proliferación de PBMC de chimpancé y tití estimulados por células CHO que expresan CD40L en un nivel de concentración de 1mg/ml (Tabla 5 anterior). La inhibición mediante 15B8 es aproximadamente 55-73% y 68-84% en muestras de PBMC de tres chimpancés y tres titís respectivamente (Tabla 5 anterior).

Las células B activas experimentan un número de respuestas biológicas tal como proliferación y producción de anticuerpo. La activación de células B mediante antígenos dependientes de célula T involucra las células auxiliares CD4⁺ T (Th). Esta célula auxiliar T se media por un efecto concertado de la interacción de CD40 en las células B con el CD40L en la superficie de células Th junto con las interacciones de otros factores coestimuladores y citoquinas Denton M.D., Pediatr. Transplant., 1998 Feb., 2(1):6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164(2):688-97; Noelle R.J., Agents Actions Suppl., 1998, 49:17-22; Lederman S. et al., Curr. Opin. Hematol., 1996, 3(1):77-86; Mackey M.F., et al., J. Leukoc. Biol., 1998, 63(4):418-428). Para probar si el 15B8 puede bloquear la célula auxiliar T mediada por la producción de anticuerpo de célula B, las células B sanguíneas periféricas humanas purificadas se cultivan en la presencia de células T activadas irradiadas purificadas con anticuerpo anti-CD3. Un ensayo ELISA se utiliza para medir el nivel de producción de IgM. El 15B8 reduce la producción de IgM mediante aproximadamente 30% en este ensayo (datos no mostrados). Por lo tanto, el 15B8 puede reducir la producción de inmunoglobulina de célula B mediada por célula T.

En resumen, el 15B8 inhibe el CD40L que induce la proliferación de Bpcell/PBMC en humanos, chimpancés y tití, e inhibe la producción de anticuerpo inducida por célula T mediante células B humanas purificadas *in*

vitro. Estos datos demuestran que el 15B8 es un anticuerpo anti-CD40 antagonístico en células B humanas y los PBMC de chimpancés y titís *in vitro*.

EJEMPLO 16

5 EL 15B8 ES UN ANTICUERPO CD40 ANTIMONO AGONISTA (CINOMOLGUS, RHESUS Y BABUINO) *IN VITRO*.

10 El análisis FACS demuestra que el 15B8 se une a CD40 expresado en la superficie de células B de sangre periférica de monos (rhesus, cinomologus y babuino). El efecto de 15B8 en PBMC de mono de Java frescamente aislado se prueba en el mismo ensayo de proliferación descrito anteriormente para humanos y chimpancés (John E. Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Vol. 13:12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., Immunology, 1993 Jul, 79(3): 439-444). En contraste al PBMC humano, se encuentra que el 15B8 estimula el PBMC del mono de Java para proliferar *in vitro* según se mide por la incorporación de ³H metil-timidina (Tabla 13 adelante). En el nivel de 1 µg/ml, el 15B8 estimula la proliferación de los PBMC mediante 6 - 129.7 veces según se compara con el control hulG2 de veintidós muestras de diecisiete monos probados (las muestras de los cinco monos se prueba dos veces) (Tabla 13 adelante). En el nivel de 5mg/ml, la proliferación estimulada por 15B8 es 14 - 24 veces en cuatro muestras de los monos y aproximadamente 1.25 o 1.85 veces en dos muestras de los dos monos (Tabla 13). Esto sugiere que, en el nivel de concentración de 5mg/ml, el 15B8 puede estar en el límite de una dosis sobresaturada para su efecto estimulador de proliferación en los PBMC de mono de Java. El análisis adicional de FACS de células B para estado de activación mediante marcadores de superficie indica que el 15B8 induce la sobrerregulación de CD69, CD86 y HLA-DR en células B de mono (Tabla 14). Estos datos sugieren que el 15B8 es un anticuerpo agonista para el CD40 expresado en células B de sangre periférica de monos de Java *in vitro*.

25 Para confirmar que este efecto agonístico de 15B8 no es específico del mono de Java, se desarrollan los mismos ensayos utilizando PBMC de macaco de la India y babuinos. Los resultados similares que se obtienen de las células de monos de Java se observan cómo se muestra en la Tabla 13 adelante. El 15B8 estimula la proliferación de PBMC de macaco de la India y babuinos *in vitro* (Tabla 13 adelante). La actividad agonista del 15B8 se muestra utilizando los PBMC de cinco macaco de la India y de tres babuinos (Tabla 13).

Tabla 13

Proliferación de PBMC de humanos, monos de Java y rhesus, y babuinos estimulados por 15B8 ¹						
Especies	Fuente celular	Número de muestras	Dosis (ug/ml)	hlgG2, base	CD40L, veces de incremento ³	15B8, veces de incremento ²
Humano	PBMC	5	5	1	9.36-91.60	0.49-2.28
		15	1	1	9.36-91.60	0.35-2.38
		12	0.2	1	9.36-91.60	0.41-3.74
Mono Rhesus	PBMC	5	1	1	12.71-89.67	27.34-50.9
Mono Java	PBMC	6	5	1	14.57-124.01	1.25-24.53
		22	1	1	5.15-167.73	6.13-129.74
		3	0.1	1	77.01-124.01	0.9-67.56
Babuino	PBMC	3	1	1	5.19-175.07	3.32-113.28

1. Los PBMC se cultivan *in vitro* en la presencia de control CD40L, 15B8 o hulG2.
 2. Los resultados de proliferación se reportan como la relación de la incorporación de ³H-timidina durante el control 15B8 a hulG2. Los datos de algunas muestras no están en la tabla para el CPM inducido por CD40L (control positivo) <2000.
 3. El incremento en veces para el CD40L que se muestra en la tabla es la relación del CD40L cpm al cpm de hulG2 a 5µg/ml. El CD40L transfecta células CHO que se fijan con formaldehído antes de los experimentos.

Tabla 14

Efecto del 15B8 en la sobrerregulación de marcadores activados por célula B <i>in vitro</i> mediante análisis FACS									
Especies	Fuente celular	Tiempo de incubación	Número de sujeto	CD54	CD69	HLA-DR	CD25	CD80	CD86
Humano	CD20 de PBMC	4h-24h	3	-	-	-	-	N/A	-
Mono cino	CD20/19 de PBMC	4h-3 días	2	NA	Hasta 1/2	Hasta 1/1 (día 3)	-	-	Hasta 1/1 (día 3)

1. “-” significa sin sobrerregulación
2. “N/A” significa no medido o no exitoso
3. Solo células de un cino, se analizan mediante FACS en el día 3.

EJEMPLO 17

EL 15B8 ES UN ANTICUERPO ANTI CD40 AGONISTA *IN VIVO* EN MONOS CINOMOLGUS.

- 5 El 15B8 puede estimular la proliferación y la sobrerregulación de los marcadores de activación de superficie celular en PBMC de monos de Java *in vitro*. Para determinar si el 15B8 es un anticuerpo anti-CD40 agonista en los monos *in vivo*, se desarrolla un estudio para examinar la biodistribución del 15B8 y el destino de células B periféricas afectadas (es decir extravasación, apoptosis, estado de activación, o lisis complementa) [Biodistribution 15B8.72 Antibodies following Intravenous Administration to Non-Naïve Male y
- 10 Female Cynomolgus Monkeys (SNBL.218.3, SNBL USA)].

Los monos de Java (1 hembra y 2 machos) reciben una única administración intravenosa de 3 mg/kg de 15B8. Se monitorean los siguientes parámetros: signos clínicos, consumo de alimento, peso corporal, farmacocinéticas, complemento de suero (CH50), citometría de flujo para células B (que incluye células B apoptóticas), células T, y monocitos. También se mide la saturación del receptor CD40 de célula B con 15B8. A los animales se les practica la necropsia 24 horas después de recibir la única dosis de 15B8, y se pesan los órganos estándar. Las biopsias quirúrgicas preestudiadas de bazo y nodos linfáticos axilares tomadas sirven como controles de valores iniciales. En la necropsia, se toman muestras de tejidos linfoides y no linfoides para histopatología e inmunohistoquímica. Los tejidos se inmunotiñen con anticuerpos contra los antígenos CD3, CD40, CD20, CD27, y CD38. Los resultados preliminares del estudio se discuten

15 adelante.

Todos los animales sobreviven a la necropsia programada y no existen efectos en el consumo de alimento, peso corporal, niveles CH50 ni en conteos de monocito o células T de sangre periférica. No existen cambios en los pesos del órgano. El examen microscópico del bazo muestra hiperplasia folicular difusa moderada con necrosis y/o infiltrados neutrófilos en los centros germinales de todos los animales tratados con 15B8. El examen de los nodos linfáticos mesentéricos e inguinales revela hiperplasia folicular moderada en 2/3

25 animales. El tratamiento que no relaciona los efectos microscópicos se ven en otros tejidos (hígado, piel, cerebro, tiroides, pulmón, médula ósea, glándula adrenal y riñón).

El inmunoteñido con anticuerpos CD20, CD27, CD40 y CD86 revela incrementos en estos marcadores en los folículos de nodos linfáticos o esplénicos, que se correlaciona con la hiperplasia folicular se ven en estos mismos tejidos. El incremento en el teñido de CD20 y CD40 se limita al bazo y al nodo linfático aunque no exista algo de teñido adicional del tejido hepático con CD27 y de células Kupffer hepáticas y de células inflamatorias mediante CD86. El teñido de CD86 también se incrementa en células medulares tímicas células y leucocitos intersticiales adrenales. No existen cambios en el inmunoteñido de CD3 en animales

30 tratados con 15B8 cuando se compara con los controles.

Estos hallazgos indican que una dosis única de 3 mg/kg de 15B8 administrada al mono de Java puede originar la proliferación de folículos linfoides y/o la redistribución de células B de la sangre periférica en el bazo y los nodos linfáticos dentro de un periodo de 24 horas. Los anticuerpos para CD20, CD27, CD40 y CD86 reconoce antígenos expresados en células B y/o activados en células B, junto con el reconocimiento de otros tipos celulares. Los números incrementados de las células que expresan estos antígenos se ven en el bazo y los nodos linfáticos de animales tratados, lo que sugiere un incremento en el número de células B

35

40

CD20+ activadas. Este estudio sugiere que el 15B8 Es un anticuerpo anti-CD40 agonista en el mono de Java *in vivo*. Los resultados obtenidos *in vivo e in vivo* son consistentes en los monos de Java.

Los resultados sugieren que el 15B8 es un anticuerpo anti-CD40 agonístico en monos de Java y rhesus y babuinos, y un anticuerpo antagonístico en humanos, chimpancés y titís.

- 5 El 15B8 es un anticuerpo monoclonal CD40 antihumano con el subtipo IgG2 humano y con reactividad cruzada para CD40 solo de primates no humanos. A través de la prueba extensiva *in vitro*, se muestra que el 15B8 es un anti- CD40 antagonístico para el CD40 expresado en células B humanas, PBMC de humano, chimpancé y tití. Sin embargo, se muestra que el 15B8 tiene actividad agonística cuando se vincula al CD40 expresado en PBMC de monos (de Java, de la India y babuinos) *in vitro*. Esta actividad agonística del 15B8 se confirma *in vivo* en los monos de Java. Cuando se prueba en el cultivo primario las células de linfoma de pacientes son sensibles a Rituxan y de pacientes resistentes a NHL, el 15B8 no tiene actividad agonista en la presencia y ausencia de IL-4. El 15B8 también puede inhibir el CD40L que estimula el crecimiento de las células de linfoma del grupo similar de pacientes bajo ambas condiciones. El 15B8 tendrá el potencial de modificar las malignidades de célula B, tal como linfoma no Hodgkin (NHL), en donde la ruta CD40/CD40L puede jugar un papel en la patogenia de las enfermedades. Los resultados se resumen en las tablas adelante.

Tabla 15

Ensayos de Medición de Actividad Agonística		
Ensayo	Metodología	Especies probadas (+ o – Actividad Agonística)
Efecto de 15B8 en la proliferación de célula B	Incorporación de ³ H-timidina comparada de células B purificadas de la sangre periférica en la presencia de 15B8 con la incorporación en la presencia de CD40L o un anticuerpo agonístico 626.1	• Humano (-)
Efecto de 15B8 en la proliferación de PBMC	Incorporación de ³ H-timidina comparada de PBMC en la presencia de 15B8 con la incorporación en la presencia de CD40L o el control de isotipo	• Humano (-) • Chimpancé (-) • Mono de Java(+) • Mono macaco de la india (+) • Babuino (+) • tití (-)
Efecto de 15B8 en la sobrerregulación de los marcadores de activación de célula B	Sobrerregulación medida en la expresión de la activación de marcadores de célula B en PBMC estimulados por 15B8 o su control de isotipo utilizando análisis FACS; que compara el efecto de 15B8 con aquel del control de isotipo	• Humano (-) • Chimpancé (-) • Mono de Java(+) • Mono macaco de la india (+) • Babuino (+) • tití (-)
Efecto en la proliferación de PBMC del 15B8 reticulado a un anticuerpo secundario fijado a una superficie de plástico	Incorporación de ³ H-timidina comparada en la presencia del segundo 15B8 reticulado por Ab con la incorporación en la presencia de CD40L 15B8 solo o el control de isotipo	• Humano (-) • Chimpancé (-)
Efecto de 15B8 en la sobrerregulación de FasL y apoptosis	Sobrerregulación medida en la expresión de FasL y apoptosis mediante la detección de FACS de células B con teñido positivo de anti-FasL y Anexina V (marcador para apoptosis) mediante la estimulación de CD40L, 15B8 y el control de isotipo.	• Humano (-) • Chimpancés (-) • Mono cinomologus (-/+)

Tabla 16

<u>Ensayos de Medición de Actividad Antagónica</u>		
Ensayo	Metodología	Especies probadas (+ o – Actividad Antagónica)
Inhibición mediante 15B8 de proliferación de célula B mediada por CD40L	Estimulación de la proliferación de célula B mediante células CHO que expresan CD40L se mide por la incorporación de ³ H-timidina. Compara la incorporación de H-timidina en la presencia de 15B8 con que en la presencia de control de isotipo	<ul style="list-style-type: none"> • Humano (+) • tití (+) • Chimpancés (+)
Inhibición mediante 15138 de la producción de anticuerpo de células B mediada por la célula auxiliar T	Las células B se cultivan con células T irradiadas purificadas activadas con el anticuerpo anti- CD3 en la presencia de 15B8. El nivel de la producción de IgM de célula B se evalúa mediante ELISA.	<ul style="list-style-type: none"> • Humano (+)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Chu, Keting
Wang, Changyu
Yoshihara, Corrine
Donnelly, John J.
- <120> ANTICUERPOS ANTI-CD40 HUMANOS
- <130> 200130.527P1/16092.001
- 10 <140> US
<141> 2000-10-02
<160> 18
<170> FastSEQ para Versión de Windows 4.0
<210> 1
- 15 <211> 978
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 1

```

gcctccacca agggcccata ggtcttcccc ctgggcgcct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg    120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtccctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatggtgtg tcgagtgccc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggagggtc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggctctca acaaaggcct ccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tcctgtctc cgggtaaa
    
```

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1           5           10           15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    
```

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

<210> 3

<211> 324

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaaattgttt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aggagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	tacagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctggaaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcat	cagtatggta	actcatttccg	gacgttcggc	300
caagggacca	aggtggaat	caaa				324

<210> 4

<211> 348

10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

cagggtgctgc aggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc      60
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgg actgggtccg ccaggctcca      120
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagtttta tcatatgctg gaagtaataa atactatgca      180
gactcagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgcg agatcacagtg      300
aggggctttg actactgggg ccagggaatc ctggtcaccg tctcctca      348

```

<210> 5

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gaccattgta catagtaatg gacacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ccaaagtctt caaccgattt      180
tctgggttcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg agcctgagga tctgggaatt tattattgct ttcaaggttc acatgttcca      300
ttcactttcg gccctgggac caaagtgtat atcaaa      336

```

<210> 6

<211> 354

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtat taaatactat      180
gctgactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt actactgtgc gagagatcat      300
gggagtaacc cccttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca      354

```

<210> 7

15 <211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

gatattgtga tgaccagtc tccactctct ctgtccgtcg ccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgta agtctagtca gagcctcctg gagagttatg gagagaccta tttgtattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgcagttt taagcgggtc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat gcagcttctc      300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa      336

```

20 <210> 8

<211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat aactttggca tacactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtga taaatattat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgaat      240
ctgcaaatga atagtctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgt      300
cggatattact accactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccat ggtcacgcgc      360
tcctca

```

<210> 9

<211> 527

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

tggacatata tatgggtgac aatgacatcc actttgcctt tctctccaca ggcgcgcact      60
cccaggtgca gctgcagcag tctggggctg aggtgaagaa gcctggggcc tcagtgaagg      120
tctcctgcaa ggcttctgga tacaccttca ccgactacta tatgactggg gtgcgcacagg      180
cccctggaca aggacttgag tggatgggat ggatcaaccc taacagtggt ggcacaaaact      240
atgcacagaa gtttcagggc agggtcacca tgaccagggg cacgtccatc agtatagcct      300
acatggagct ggacaggctg agatctgacg acacggccgt gtattactgt gcgagagatg      360
agatcctagc agcagatggt atctactatt tctacggtct ggacgtctgg ggccaagggg      420
ccacggtcac cgtctcctca ggtgagtcct gtcgacggat ccacccaatg cccatgagcc      480
cagacactgg acgctgaacc tcgcggacag ttaagaaccc agggggcc      527

```

<210> 10

<211> 351

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tggactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt ttatcatatg atggaagtaa taagtactat      180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat      240
ctgcaattga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagatata      300
gtgaggggct ttgactactg gggccagggg atcctggtca ccgtctctc a      351

```

<210> 11

15 <211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp His Gly Ser Asn Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 117

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 112

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

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

```

```

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

```

<210> 17

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula B humana normal, dicho anticuerpo monoclonal o fragmento está libre de actividad agonística significativa cuando dicho anticuerpo monoclonal o fragmento se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B normal, por lo cual, cuando dicho anticuerpo monoclonal o fragmento se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B normal, el crecimiento o diferenciación de dicha célula B normal se inhibe, en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que contiene los residuos 31-35, 50-66, y 99-111 de la SEQ ID NO:13, y comprende una región variable de cadena liviana que contiene los residuos 24-39, 55-61, y 94-102 de la SEQ ID NO:17.
2. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13.
3. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 17.
4. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 17.
5. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que posee por lo menos una de las siguientes actividades biológicas:
- (i) inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas estimuladas por células T;
 - (ii) inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células T Jurkat; y
 - (iii) inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células que expresan CD40L.
6. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que posee las siguientes actividades biológicas:
- (i) inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas estimuladas por células T;
 - (ii) inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células T Jurkat; y
 - (iii) inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas estimuladas por células que expresan CD40L.
7. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) seleccionada del grupo que consiste de por lo menos 10^{-5} M, por lo menos 10^{-7} M, por lo menos 10^{-9} M, y por lo menos 10^{-11} M.
8. El fragmento de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho fragmento es un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab, o un fragmento Fv de dicho anticuerpo monoclonal.
9. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en terapia.
10. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en (i) evitar o tratar una enfermedad mediada por el anticuerpo en un paciente, (ii) evitar o tratar una enfermedad mediada por IgE en un paciente, o (iii) evitar o tratar una enfermedad autoinmune en un paciente.
11. Uso de un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la fabricación de un medicamento para (i) evitar o tratar una enfermedad mediada por el anticuerpo en un paciente, (ii) evitar o tratar una enfermedad mediada por IgE en un paciente, o (iii) evitar o tratar una enfermedad autoinmune en un paciente.

12. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en inhibir la producción de anticuerpo mediante células B en un paciente humano.
- 5 13. Uso de un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpo mediante células B en un paciente humano.
- 10 14. Un método para inhibir el crecimiento o diferenciación de una célula B humana normal, o para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en donde dicha proliferación se aumenta mediante la interacción de un ligando CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de una célula B, dicho método comprende poner en contacto dicha célula B *in vitro con* una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 15 15. Un hibridoma que es capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
16. Un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
17. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la secuencia de polinucleótido establecida en la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.
- 20 18. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Efecto de McAbs anti-hCD40 en proliferación de células B estimuladas con CD40L

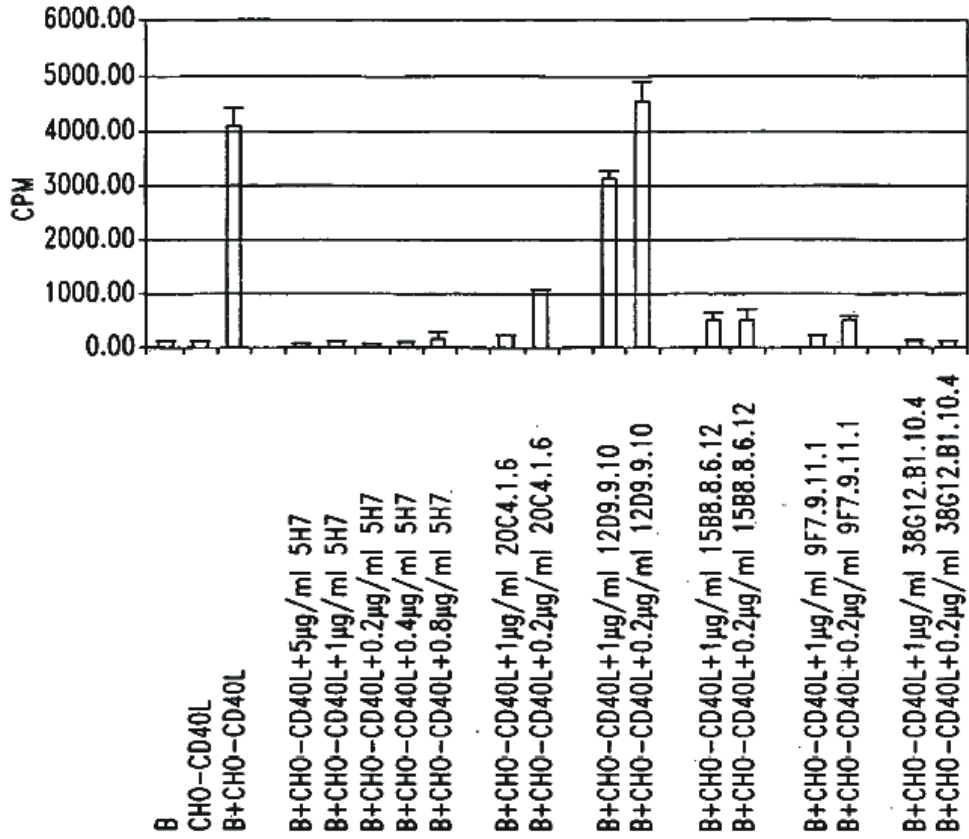


Fig. 1

Nuevos McAbs anti-hCD40 en proliferación de células B inducidas por anti-IgM

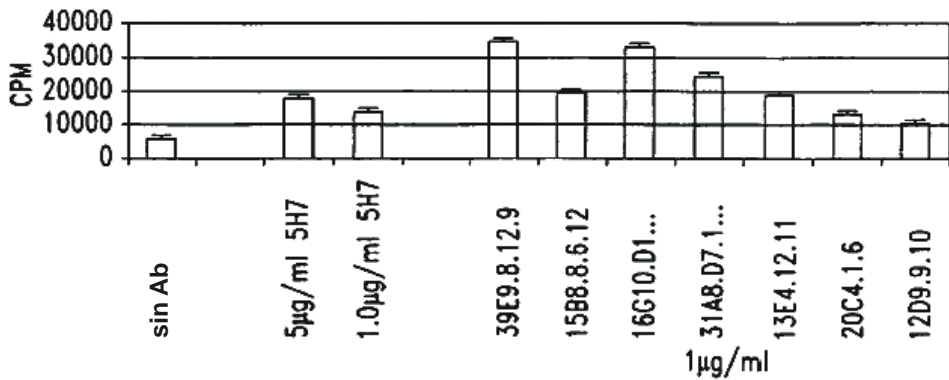


Fig. 3

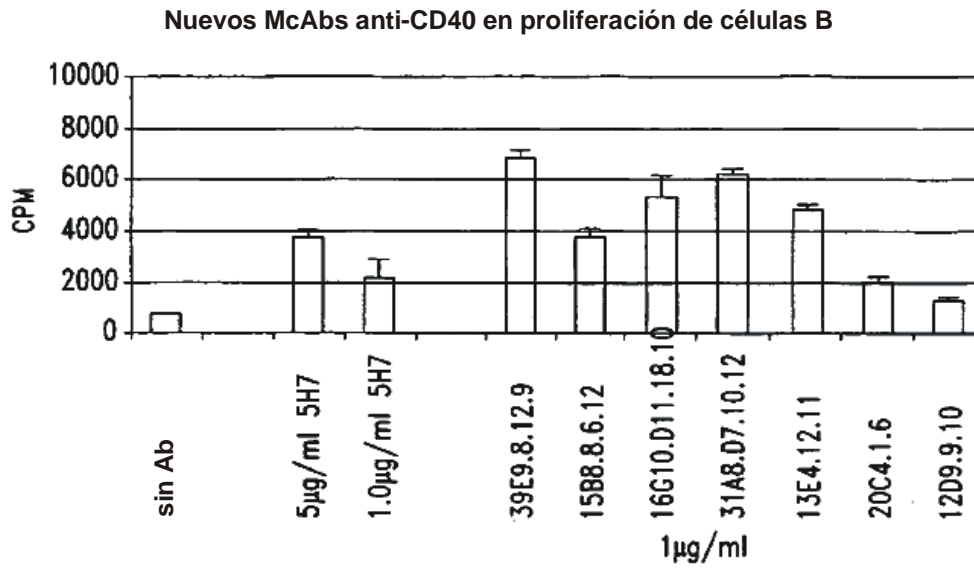


Fig. 2

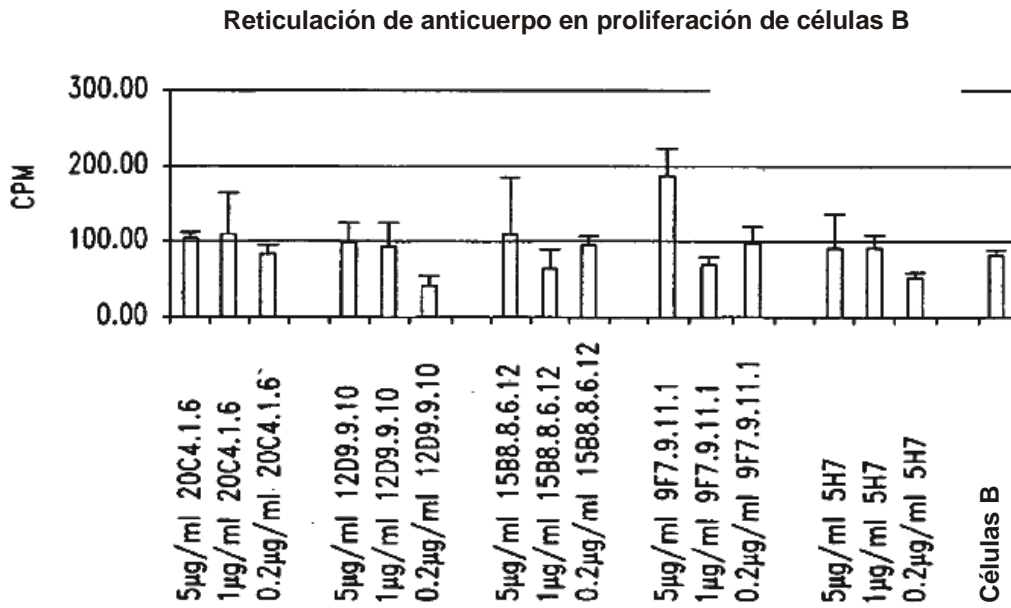


Fig. 4

Secuencia 2. secuencia de aminoácido deducida de cadena ligera de hibridomas seleccionados comparados con 5H7

Frm1	CDR1	Frm2	CDR2
5H7	<u>DIVITQAPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLVNSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS</u>		
9F7	-VLM--T-----TI-H--H--E-----S-----		
15B8	---M--S---S-AP-QP----K-----LE-V-Q---Y-----P-Q---AVFK---		
12D9	E--L--S-GT-SL-P-ER-TL---A--- VSYSYLA--Q-----A-R---GA-S-AT		
20C4	E--L--S-GT-SL-P-EG-TL---A--- VSYSYLA--Q-----A-R---GA-S-AT		
13E4	--QL--S-S--SA-V--RVT-T--A--G IRN DLG--Q-----A-RR---AA-SLQ-		

Frm3	CDR3	Frm4
5H7	<u>GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLELK</u>	
9F7	-----P---I-Y-F-GS---F---P---VYI-	
15B8	-----V---Y-M--MQL-L-----V-I-	
12D9	-I-----T---L-P--FA--Y-Q-YGSSFR--Q---Q-I-	
20C4	-I-----T---L-P--FA--Y-H-YGNSFR--Q---V-I-	
13E4	---S---R---E---T--SLQP--PAT-Y-L-HNSS-CS--Q-----I-	

Fig. 5

Cadena Pesada

Frm1	CDR1	Frm2	CDR2
5H7 <u>QVQLQESGPGLVAPSSLSITCTVSGFSL</u>	<u>RYSVY</u>	<u>WVRQPPGKLEWLG</u>	<u>MMWGGGSTDYNSALKS</u>
9F7 -----G-V-Q-GR--RLS-AA---TF-	S-GMH	---A-----VA	VISYD--IK-YADSVKG
12D9 -----G-V-Q-GR--RLS-AA---TF-	S-GMD	---A-----VA	VLSYD--NK-YADSVKG
13E4 ----Q--AEVKK-GA-VKVS-KA--YTFT	D-YMH	---A--Q---M-	WINPNSGGTNYAQKFQG
15B8 -----G-V-Q-GR--RLS-AA---TFN	NFGIH	---A-----VA	VISYD--DK-YADSVKG
20C4 -----G-V-Q-GR--RLS-AA---TF-	S-GMD	---A-----VA	VLSYA--NK-YADSVKG

Frm3	CDR3	Frm4
5H7 <u>RLSISKDTSKSVFLKMNSLQTDITAMYYCVR</u>	<u>TDG</u> <u>DY</u>	<u>WGQGTSTVTVSS</u>
9F7 -FT--R-N--NTLY-Q---RAE---V--A-	DH-SNPL --	----L----
12D9 -FT--R-N--NTLY-QL---RAE---V--A-	DTVRGF --	----IL----
13E4 -VTMTR---I-IAYMELDR-RS---V--A-	DETLAADGIYYFYGL-V	----T----
15B8 -FT--R-N--NTLN-Q---RAE---V--A-	DRRYYYHYGM -V	----M----
20C4 -FT--R-N--NTLY-Q---RPE---V--A-	DTVRGF -Y	----IL----

Cadena Ligera

Frm1	CDR1	Frm2	CDR2
5H7 <u>DIVITQAPLSLPVSLGDAQASISC</u>	<u>RSSQSLVNSNGNTYLH</u>	<u>WYLQKPGQSPKLLIY</u>	<u>KVSNRFS</u>
9F7 -VLM--T-----	----TI-H--H--E	-----S	-----
12D9 E--L--S-GT-SL-P-ER-TL--	-A--- VSYSYLA	--Q-----A-R----	GA-S-AT
13E4 --QL--S-S--SA-V--RVT-T-	-A--G IRN DLG	--Q-----A-RR---	AA-SLQ-
15B8 ---M--S---S-AP-QP-----	K-----LE-Y-E---Y	-----P-Q----	AVFK---
20C4 E--L--S-GT-SL-P-EG-TL--	-A--- VSYSYLA	--Q-----A-R----	GA-S-AT

Frm3	CDR3	Frm4
5H7 <u>GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYFC</u>	<u>SQSTHPVWT</u>	<u>FGGGTKLELK</u>
9F7 -----P---I-Y-	F-GS---F-	--P---VYI-
12D9 -I-----T---L-P--FA--Y-	Q-YGSSFR-	--Q---Q-I-
13E4 ---S-----R---E---T--SLQP--FAT-Y-	L-HNSS-CS	--Q-----I-
15B8 -----V---Y-	M--MQL-L-	-----V-I-
20C4 -I-----T---L-P--FA--Y-	H-YGNSFR-	--Q---V-I-

Fig. 6

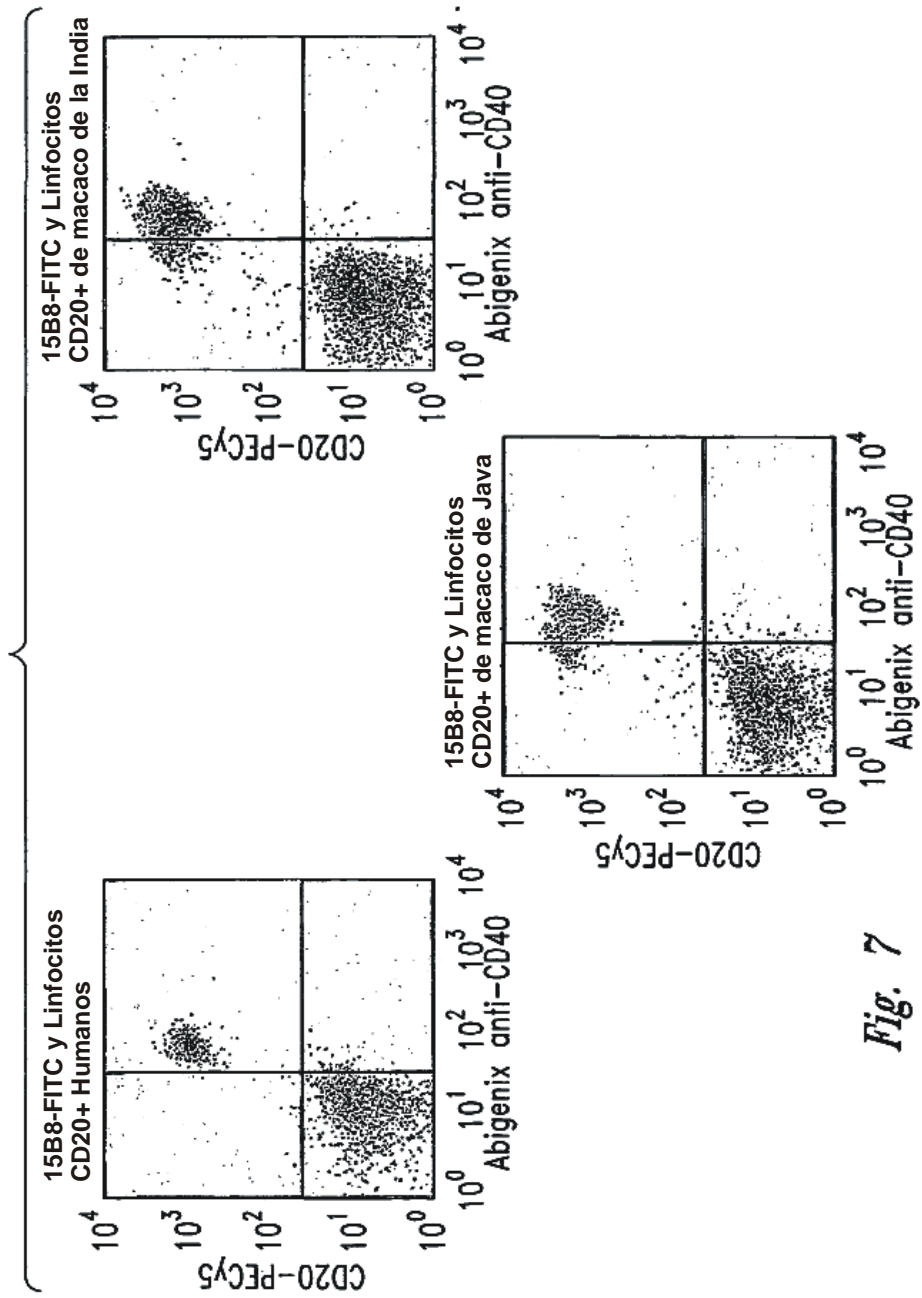


Fig. 7

12D9vk

```

+2      E I V L T Q S P G T L S I
      GAAATTG TGTGACGCA GTCTCCAGGC ACCCTGTCTT
      GGCTTTAAC ACAACTGCGT CAGAGGTCCG TGGGACAGAA

+2 L S P G E R A T L S C R A S Q S V
51  TGTCTCCAGG GGAAAGAGCC ACCCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAGTGTT
      ACAGAGGTCC CCTTTCTCGG TGGGAGAGGA CGTCCCGGTC AGTCTCACAA

+2 S Y S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R
101 AGCTACAGCT ACTTAGCCTG GTACCAGCAG AACCTGGCC ABBCTCCCAG
      TCGATGTCGA TGAATCGGAC CATGGTCGTC TTTGGACCGG TCCGAGGGTC

+2 L L I Y G A S S R A T G I P D R
151 ACTCCTCATC TATGGTGCAT CCAGCAGGGC CACTGGCATC CCAGACAGGT
      TGAGGAGTAG ATACCACGTA GGTGTCCTCCG GTGACCGTAG GGTCTGTCCA

+2 F S G S G S G T D F T L T I S R L
201 TCAGTGGCAG TGGGTCTGGA ACAGACTTCA CTCTCACCAT CAGCAGACTG
      AGTCACCGTC ACCCAGACCT TGTCTGAAGT GAGAGTGGTA GTCGTCTGAC

+2 E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S F
251 GAGCCTGAGG ATTTTGCAGT GTATTACTGT CAGCAGTATG GTAGTCATT
      CTCGGACTCC TAAAACGTCA CATAATGACA GTCGTCATAC CATCGAGTAA

+2 R T F G Q G T K Q E I K
301 TCGGACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGCAGGA GATCAAA
      AGCCTGCAAG CCGGTTCCCT GGTTGTCCT CTAGTTT

```

Fig. 8

12d9Const						
GCCTCCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCGCCCT	GCTCCAGGAG	CACCTCCGAG	60
AGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTG	120
TGGAACTCAG	GCGCTCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CAGCTGTCCT	ACAGTCCTCA	180
GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAACTTCGG	CACCCAGACC	240
TACACCTGCA	ACGTAGATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAC	AGTTGAGCGC	300
AAATGTTGTG	TCGAGTGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCACCTG	TGGCAGGACC	GTCAGTCTTC	360
CTTTCCCC	CAAAACCCAA	GGACACCTC	ATGATCTCCC	GGACCCCTGA	GGTACGTGC	420
GTGGTGGTGG	ACGTGAGCCA	CGAAGACCC	GAGGTCCAGT	TCAACTGGTA	CGTGGACGGC	480
GTGGAGGTGC	ATAATGCCAA	GACAAAGCCA	CGGGAGGAGC	AGTTCAACAG	CACGTTCCGT	540
GTGGTCAGCG	TCCTCACCGT	TGTGCACCAG	GACTGGCTGA	ACGGCAAGGA	GTACAAGTGC	600
AAGGTCTCCA	ACAAAGGCCT	CCCAGCCCC	ATCGAGAAAA	CCATCTCAA	AACCAAAGGG	660
CAGCCCCGAG	AACCACAGGT	GTACACCTG	CCCCATCCC	GGGAGGAGAT	GACCAAGAAC	720
CAGGTCAGCC	TGACCTGCCT	GGTCAAAGGC	TTCTACCCCA	GCGACATCGC	CGTGGAGTGG	780
GAGAGCAATG	GGCAGCCGGA	GAACAACACTAC	AAGACCACAC	CTCCCATGCT	GGACTCCGAC	840
GGCTCCTTCT	TCCTCTACAG	CAAGCTCACC	GTGGACAAGA	GCAGGTGGCA	GCAGGGGAAC	900
GTCTTCTCAT	GCTCCGTGAT	GCATGAGGCT	CTGCACAACC	ACTACACGCA	GAAGAGCCTC	960
TCCTGTCTC	CGGGTAAA					978
ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYLSVVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDHKPS	NTKVDKTVR	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

Fig. 9

20C4vk.1

GAAATTGTTT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AGGAGCCACC	60
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC TACAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA	120
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA	180
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGAACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	240
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTGCAT CAGTATGGTA ACTCATTTTCG GACGTTCCGC	300
CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAA	324

20C4vh1

CAGGTGCTGC AGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG GGAGGTCCCT GAGACTCTCC	60
TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCACTAGC TATGGCATGG ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA	120
GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT GGCAGTTTTA TCATATGCTG GAAGTAATAA ATACTATGCA	180
GACTCAGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG	240
CAAATGAACA GCCTGAGACC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGCG AGATACAGTG	300
AGGGGCTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAATC CTGGTCACCG TCTCCTCA	348

Fig. 10

9F7vk.1

GATGTTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGGAGA TCAAGCCTCC	60
ATCTCTTGCA GATCTAGTCA GACCATTGTA CATAGTAATG GACACACCTA TTTAGAATGG	120
TACCTGCAGA AACCAGGCCA GTCTCCAAG CTCCTGATCT CCAAAGTTTC CAACCGATTT	180
TCTGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTAC ACTCAAGATC	240
AGCAGAGTGG AGCCTGAGGA TCTGGGAATT TATTATTGCT TTCAAGGTTT ACATGTTCCA	300
TTCACTTTTC GCCCTGGGAC CAAAGTGTAT ATCAA	336

9F7vh1

CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATGGCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT	120
CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTGGCAGTT ATATCATATG ATGGAAGTAT TAAATACTAT	180
GCTGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTGT ACTACTGTGC GAGAGATCAT	300
GGGAGTAACC CCCTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC CTCA	354

Fig. 11

15B8vk.3

GATATTGTA TGACCCAGTC TCCACTCTCT CTGTCCGTCG CCCCTGGACA GCCGGCCTCC	60
ATCTCCTGTA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG GAGAGTTATG GAGAGACCTA TTTGTATTGG	120
TACCTGCAGA AGCCAGGCCA GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGCAGTTTT TAAGCGGTTC	180
TCTGGAGTGC CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC	240
AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT GCAGCTTCCT	300
CTCACTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAA	336

15B8vh1

CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAAT AACTTTGGCA TACTGTTGGT CCGCCAGGCT	120
CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTGGCAGTT ATATCATATG ATGGAAGTGA TAAATATTAT	180
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGAAT	240
CTGCAAATGA ATAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGATCGT	300
CGGTATTACT ACCACTACTA CGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAT GGTACCAGTC	360
TCCTCA	366

Fig. 12

13E4vh1

CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC TGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGGCCTC AGTGAAGGTC	60
TCCTGCAAGG CTTCTGGATA CACCTTACC GACTACTATA TGCACTGGT GCGACAGGCC	120
CCTGGACAAG GACTTGAGTG GATGGGATGG ATCAACCCTA ACAGTGGTGG CACAACTAT	180
GCACAGAAGT TTCAGGGCAG GGTACCATG ACCAGGGACA CGTCCATCAG TATAGCCTAC	240
ATGGAGCTGG ACAGGCTGAG ATCTGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGATGAG	300
ATCCTAGCAG CAGATGGTAT CTAATAATTC TACGGTCTGG ACCTCTGGGG CCAAGGGACC	360
ACGGTCACCG TCTCCTCA	378

12D9vh1

CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCACT AGCTATGGCA TGGACTGGT CCGCCAGGCT	120
CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTGGCAGTT TTATCATATG ATGGAAGTAA TAAGTACTAT	180
GCAGACTCAG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACTGTAT	240
CTGCAATTGA ACAGCCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GCGAGATACA	300
GTGAGGGGCT TTGACTACTG GGGCCAGGGA ATCCTGGTCA CCGTCTCCTC A	351

Fig. 13

9F7VH1

QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARDHGSNPLDYWGQGLVTVSS

12D9VH1

QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWAVLSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQLNSLRAEDTAVYYCARDTVRQFDYWGQGLVTVSS

15B8VH1

QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIFGIHWVRQAPGKLEWAVISYDGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLN
LQMNSLRAEDTAVYYCARDRRYYYHYGMVWQGMVTVSS

20C4VH1

QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWAVLSYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCARDTVRQFDYWGQGLVTVSS

9F7VK1

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQTI VHSNGHTYLEWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEPEDLGIIYCFQGSHPFTFGPGTKVYIK

12D9VK1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQYVGSFRFTFGQGTKQ

15B8VK2

DIVMTQSPSLSVAPGQPASISCKSSQSLESYGETYLYWYLQKPGQPPQLLIYAVFKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYYCMQSMQLPLTFGGGTKVEIK

20C4VK1

EIVLTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSYSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCHQYGNFRFTFGQGTKVEIK

Fig. 14

Efecto de anticuerpos anti-CD40 en la proliferación de células de linfoma (sin IL-4)

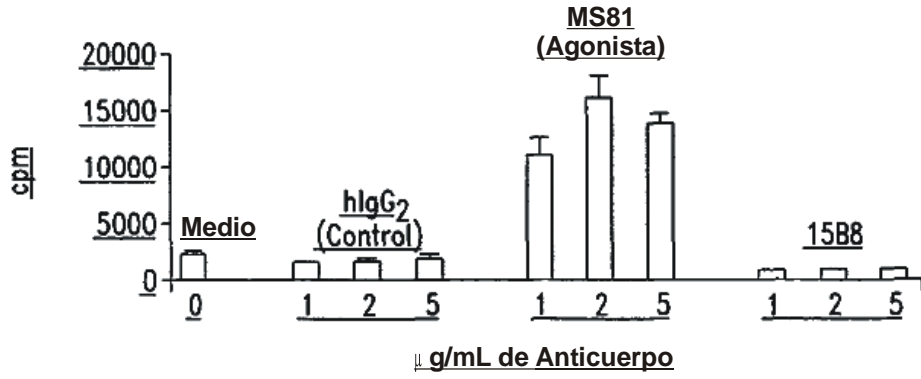


Fig. 15

Efecto de anticuerpos anti-CD40 en la proliferación de células de linfoma (+ IL-4)

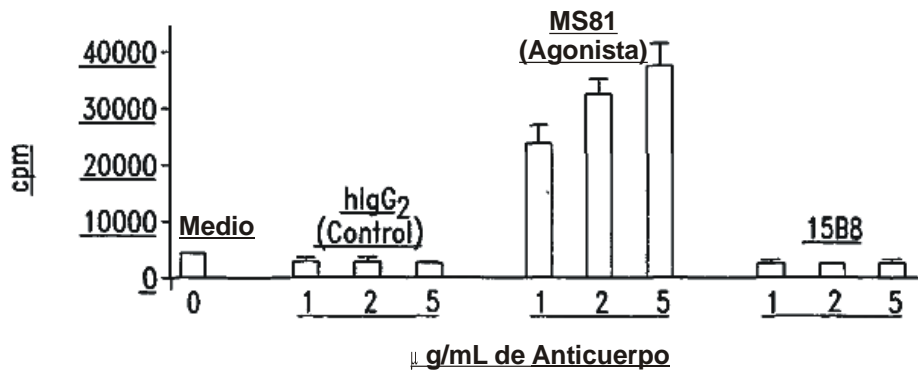


Fig. 16

Efecto de anticuerpos anti-CD40 en la proliferación de células de linfoma

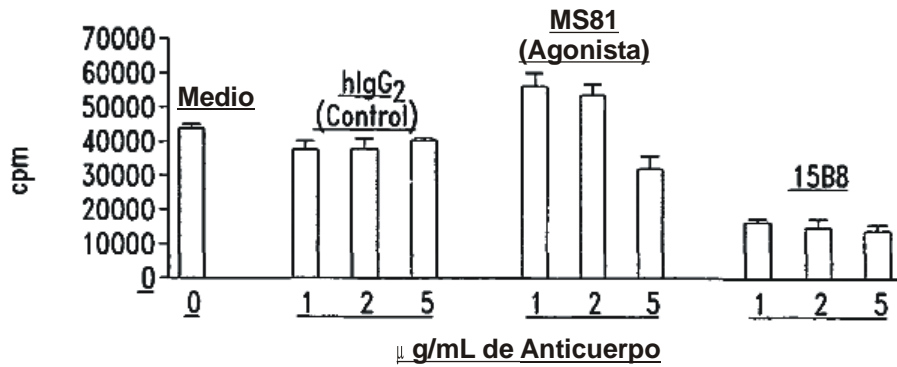


Fig. 17

Respuesta de dosis a 15B8 en proliferación de Células NHL de Paciente A estimulado por CD40L e IL4

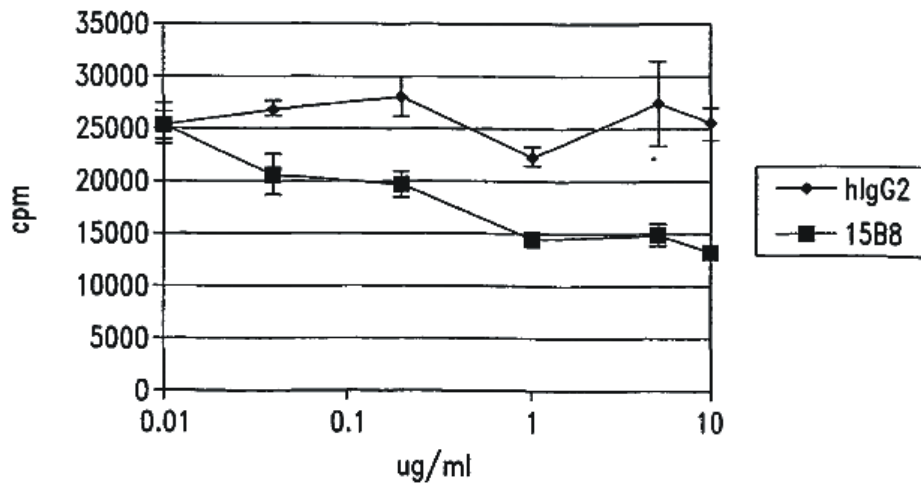


Fig. 18

**Respuesta de dosis a 15B8 en proliferación de Células B
estimuladas por CD40L**

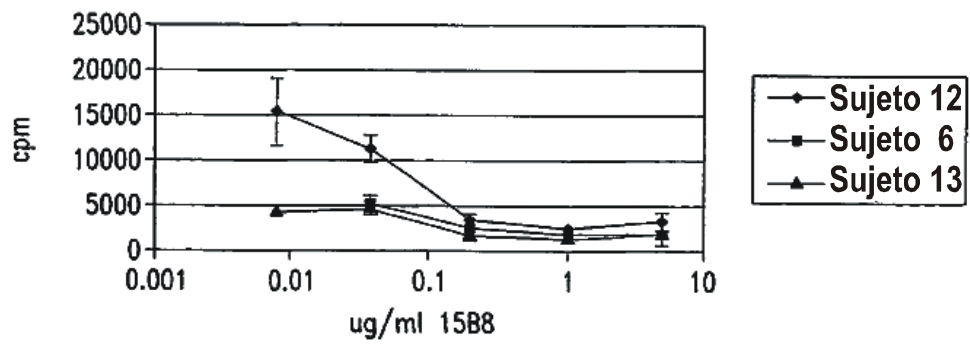


Fig. 19