

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 163**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2007 E 07747426 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2019840**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 humano**

30 Prioridad:

**09.05.2006 EP 06076028**  
**09.05.2006 US 798819 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.06.2013**

73 Titular/es:

**FAST FORWARD PHARMACEUTICALS B.V.**  
**(100.0%)**  
**Yalelaan 46**  
**3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**DEN HARTOG, MARCEL THEODORUS;**  
**VAN NEERVEN, RUPRECHT JULES JOOST;**  
**JOHNSON, KEVIN STUART y**  
**CASSON, ROBERT DUNCAN**

74 Agente/Representante:

**ES 2 406 163 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

Anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 humano

La invención se refiere a anticuerpos humanos, humanizados y monoclonales con inmunogenicidad reducida, usos y procedimientos de producción de los mismos. La invención se refiere en particular a anticuerpos monoclonales antagonistas anti CD40 humano.

La molécula CD40 es una glicoproteína de membrana de tipo I de 50 kDa y se expresa en linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas (DC) y células endoteliales activadas<sup>1-6</sup>. En ciertas condiciones, también se puede encontrar CD40 en fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos<sup>7</sup>. El ligando de CD40 (CD40L, CD154), una glicoproteína de membrana integral de tipo II de 32 kDa, se expresa de forma transitoria en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y una población pequeña de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados<sup>8,9</sup>. Además, se ha descubierto CD40L en varios otros tipos celulares después de activación, incluyendo mastocitos, basófilos, linfocitos B, eosinófilos, DC y plaquetas.<sup>10,11</sup>

Estudios en modelos murinos han demostrado claramente la implicación de la interacción CD40L-CD40 en la patofisiología de diversas enfermedades autoinmunes (para una revisión, véase la referencia<sup>12</sup>). Las pruebas de ratones transgénicos CD40L, que adquieren enfermedad inflamatoria del intestino letal, proporcionaron las primeras pruebas de que las interacciones CD40-CD40L también podrían desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades inflamatorias del intestino<sup>13</sup>. Un anticuerpo monoclonal anti CD40L de ratón (mAb) evita eficazmente la inflamación de la mucosa y la producción de interferón- $\gamma$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de lámina propia en colitis inducida por TNBS<sup>14</sup>. En un modelo de enfermedad inflamatoria en el intestino de ratón con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) se mostró que el tratamiento con anti CD40L desde el día de la reconstitución de linfocitos T evitó completamente la aparición clínica e histológica de colitis experimental<sup>15</sup>. Además, la administración de anti CD40L desde la semana 5 después de la reconstitución de linfocitos T aún pudo prevenir la progresión de la enfermedad y los animales tratados mostraron mejora en los síntomas de la enfermedad e histología en comparación con animales de control<sup>15</sup>. Además, la reconstitución de ratones SCID con linfocitos T de ratones con supresión de CD40L, demostró adicionalmente el papel esencial de los linfocitos T que expresan CD40L en desarrollo de enfermedades y producción de interleucina-12.<sup>16</sup>

La interacción CD40-CD40L puede antagonizarse por anticuerpos monoclonales (mAb) contra CD40L o CD40. La expresión de CD40L en plaquetas activadas ha dado como resultado acontecimientos trombo-embólicos durante el tratamiento de seres humanos con mAb IgG<sub>1</sub> anti CD40L humano a niveles de dosis mayores y terminación del desarrollo de estos Mab<sup>17, 19</sup>. El antagonismo de CD40 parece por lo tanto un enfoque más atractivo. La actividad antagonista no estimuladora de mAb 5D12 (anti CD40 humano) se demostró en diversos estudios *in vitro* usando diferentes tipos celulares que portan CD40<sup>20, 22</sup> y la actividad antagonista de 5D12 quimérico (ch5D12) se validó *in vivo* usando diversos modelos de enfermedad de primates no humanos<sup>23, 27</sup>. ch5D12 es un anticuerpo IgG<sub>4</sub> humano modificado por ingeniería genética molecularmente que contiene los dominios variables murinos de las cadenas pesada y ligera de 5D12 y se construyó para reducir el potencial de inmunogenicidad y para potenciar la semivida *in vivo* del mAb 5D12 murino usado en seres humanos.

Los pacientes con enfermedad de Crohn padecen un trastorno inflamatorio debilitante del tracto gastrointestinal cuya etiología y patogénesis precisas siguen siendo esquivas<sup>28, 29</sup>. La enfermedad se caracteriza por un flujo de entrada en mucosa enferma de linfocitos T activados, linfocitos B y macrófagos,<sup>30, 31</sup> producción local de mediadores solubles de inflamación y daño de tejidos implicados<sup>28, 29</sup>. Se ha mostrado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la mucosa y macrófagos y citocinas tales como factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-12 desempeñan un papel central en el inicio de un bucle inflamatorio en enfermedad de Crohn<sup>32, 38</sup>. Los linfocitos T de mucosa inflamada muestran una capacidad proliferativa mayor<sup>28, 29</sup> y secretan cantidades aumentadas de IFN- $\gamma$  e IL-2. Se han descubierto niveles aumentados de transcritos de ARNm de citocinas asociadas con linfocitos T en biopsias de la mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn<sup>33</sup>. Se ha sugerido un papel dominante de CD40L en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en los estudios de los inventores sobre la expresión de CD40/CD40L en lesiones de enfermedad de Crohn<sup>39</sup>. CD40L puede mediar en una activación fuerte de células portadoras de CD40, predominantemente linfocitos B y macrófagos, dando como resultado de este modo el aumento de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 en lesiones. Usando inmunohistoquímica, se descubrió tinción aumentada con 5D12 en todas las muestras de áreas enfermas de pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con áreas no enfermas. La doble tinción para CD40 y CD20 (linfocitos B) o CD68 (macrófagos) indicó que en las secciones de pacientes con enfermedad de Crohn, las células CD40<sup>+</sup> eran principalmente linfocitos B en los folículos linfoides y macrófagos en la lámina propia. Los linfocitos T de lámina propia de mucosa inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn indujeron que los monocitos produjeran cantidades significativas de IL-12 y TNF- $\alpha$  después de 48 horas de co-cultivo. La adición de 5D12 dio como resultado reducción de la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$ ; los niveles de producción se redujeron a los niveles observados usando linfocitos T de lámina propia de control tanto en ausencia como en presencia de IFN- $\gamma$ .<sup>39</sup>

Es un objetivo de la invención proporcionar moléculas alternativas que compartan al menos el tipo de seguridad y/o eficacia de 5D12 *in vivo*, no necesariamente la cantidad de dicha seguridad y/o eficacia. El anticuerpo 5D12, o al menos los dominios variables del mismo, tienen un fondo murino. La presente invención proporciona variantes de los dominios variables de cadena pesada y ligera de 5D12. Para este fin la invención proporciona un anticuerpo anti

ES 2 406 163 T3

CD40 que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX <sub>1</sub> S RYSVY WX <sub>2</sub> RQP			
41	51	61	71
PGKGX <sub>3</sub> EWX <sub>4</sub> GM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
	81	91	101
	SQVX <sub>5</sub> L KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTT VT VSS		

en la que:

- 5 X<sub>1</sub> es I y X<sub>2</sub> es V;
- X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es I;
- X<sub>1</sub> es V y X<sub>2</sub> es V;
- X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es L; o
- X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es V; y
- 10 X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;
- X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y
- X<sub>5</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y

dicho dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos

1	11	21	31
ELQLT QSPLS LPVX <sub>6</sub> L GX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> AS ISCRS SQSLX <sub>9</sub> NSNGN TYLHW			
41	51	61	71
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI			
	81	91	101
	SRVEA EDX <sub>10</sub> GV YX <sub>11</sub> CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR		

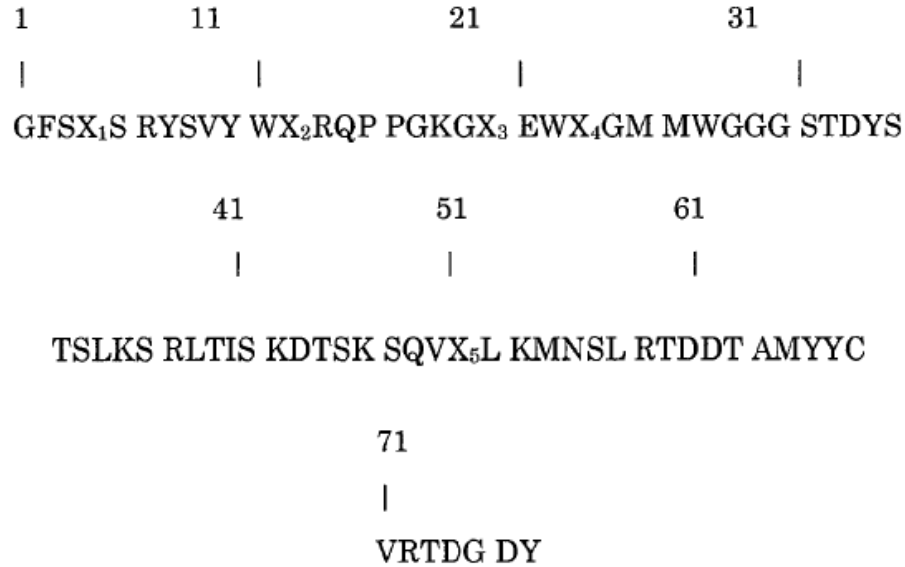
15 en la que:

- X<sub>6</sub> es N, Q, S, T, Y, W o C;
- X<sub>7</sub> es D, E, N, Q, S, T, Y, W o C;
- X<sub>8</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C;
- X<sub>9</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;

X<sub>10</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M; y

X<sub>11</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C.

También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (I)



5 en la que:

X<sub>1</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;

X<sub>2</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;

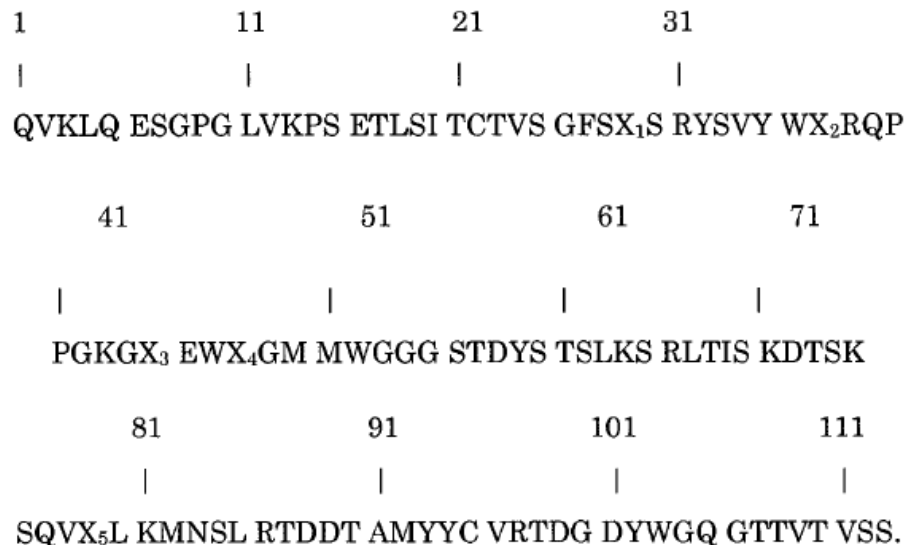
X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;

10 X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y

X<sub>5</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H.

15 Dicho polipéptido comprende identidad de secuencia extensiva con el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 5D12, sin embargo, el polipéptido es menos inmunogénico en un individuo humano, administrado como tal o en el contexto de un anticuerpo que comprende dicho polipéptido. En las posiciones indicadas X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> pueden estar presentes varios aminoácidos como se indica. Una molécula de unión que comprende un polipéptido de la invención tiene buenas propiedades de unión a CD40. Se ha observado que la producción del anticuerpo en una célula varía en cierto grado con el tipo de aminoácido en las posiciones indicadas. Esto se detallará en otro lugar posteriormente en el presente documento.

También se describe un polipéptido de fórmula (I) que comprende una secuencia de aminoácidos



En el polipéptido anteriormente mencionado abarca esencialmente el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo 5D12 murino. La secuencia de aminoácidos está alterada en varias posiciones con respecto a la secuencia murina. El polipéptido alterado acopla buenas propiedades de unión, tolerándose bien al mismo tiempo por seres humanos a los que se ha proporcionado el polipéptido. En las posiciones indicadas pueden insertarse

- 5 diversos aminoácidos sin reducir y/o alterar drásticamente al menos las propiedades inmunológicas del polipéptido en comparación con el polipéptido murino original. También se describe un polipéptido que comprende un G, A, V, L, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H en la posición X<sub>1</sub>. De este modo al menos las propiedades de producción del polipéptido en una célula de mamífero no se reducen y/o alteran drásticamente en comparación con el polipéptido murino o quimérico original. Se describe que X<sub>1</sub> es G, A, V, L, P, F o M;
- 10 X<sub>2</sub> es G, A, V, L, I, P, F o M;  
 X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;  
 X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M; y  
 X<sub>5</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T o Y.

15 Estos polipéptidos están mejor ajustados para producción a alto nivel en una célula de mamífero, particularmente en el contexto de un anticuerpo.

También se describe un polipéptido en el que:

- 20 X<sub>1</sub> es G, A, V, L o M;  
 X<sub>2</sub> es G, A, V, L, I o M;  
 X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;  
 X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I o M; y  
 X<sub>5</sub> es P, F, W, N, Q, S, T o Y.

Estos polipéptidos son más adecuados para producción de anticuerpos a alto nivel mostrando a la vez buenas propiedades de tolerancia en un ser humano. La invención proporciona además un anticuerpo como se reivindica que comprende el polipéptido de fórmula (I) en el que X<sub>1</sub> es L; X<sub>2</sub> es I; X<sub>3</sub> es P; X<sub>4</sub> es M; y/o X<sub>5</sub> es S. Este polipéptido se prefiere particularmente debido a sus excelentes propiedades de producción en el contexto de un anticuerpo que imita las propiedades de unión y farmacológicas del anticuerpo ch5D12 mientras que se mejoran propiedades inmunológicas en seres humanos en comparación con el anticuerpo murino o ch5D12 y en el que al menos la producción del polipéptido no está drásticamente reducida en comparación con el homólogo murino o quimérico.

La invención proporciona además un anticuerpo como se reivindica que comprende un polipéptido de fórmula (I) en el que X<sub>1</sub> es I; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es P; X<sub>4</sub> es M; y/o X<sub>5</sub> es S. Este polipéptido se prefiere particularmente debido a sus excelentes propiedades de producción en el contexto de un anticuerpo que imita las propiedades de unión y farmacológicas del anticuerpo ch5D12 mientras que se mejoran propiedades inmunológicas en seres humanos en comparación con el anticuerpo murino o ch5D12 y en el que al menos la producción del polipéptido no se reduce drásticamente en comparación con el homólogo murino o quimérico.

Un anticuerpo que se desvía en al menos una posición de X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> en comparación con 5D12 quimérico en las posiciones correspondientes, tiene mejores propiedades inmunológicas que el anticuerpo 5D12 quimérico en seres humanos. En una realización preferida de tales anticuerpos la invención proporciona preferentemente un polipéptido de acuerdo con la invención, en el que: X<sub>1</sub> es I y X<sub>2</sub> es V; X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es I; o X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es V. Los polipéptidos se prefieren particularmente en combinación en el que un X<sub>3</sub> es P; X<sub>4</sub> es M; y X<sub>5</sub> es F o S; en una realización la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la invención, en el que: X<sub>1</sub> es L; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es L; X<sub>4</sub> es L y X<sub>5</sub> es F. La producción de anticuerpos que comprenden dicho polipéptido es muy buena, proporcionando de forma simultánea propiedades inmunológicas mejoradas en seres humanos en comparación con ch5D12. Se describe además un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos GFSX<sub>1</sub>S RYSVY WX<sub>2</sub>R, en la que: X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es I; o X<sub>1</sub> es I y X<sub>2</sub> es V. Este polipéptido comprende una CDR1 modificada de un fragmento variable de cadena pesada de 5D12. Esta CDR1 comprende al menos un aminoácido diferente en comparación con la CDR1 del fragmento variable de cadena pesada del anticuerpo 5D12. Este cambio de aminoácidos conduce a propiedades inmunológicas mejoradas de un anticuerpo 5D12 modificado o ch5D12 en el que la modificación comprende al menos un reemplazo de la secuencia correspondiente de dicho polipéptido en 5D12 o ch5D12 con un polipéptido de la invención, permitiendo al mismo tiempo una buena producción del anticuerpo en una célula de mamífero.

Un dominio variable de cadena pesada comprende 113 aminoácidos. El polipéptido puede generarse de forma sintética o por una célula. Preferentemente dicho dominio variable de cadena pesada se produce por una célula. En la naturaleza existen al menos cinco tipos de cadenas pesadas:  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\epsilon$ , en las que cada tipo define una clase de inmunoglobulinas. Puede usarse un polipéptido como se ha descrito como un cuerpo de unión directamente o puede incorporarse en un anticuerpo. Cuando se incorpora en un anticuerpo el polipéptido se combina preferentemente con una parte constante de una cadena pesada de anticuerpo. Para este fin la invención proporciona además una cadena pesada de anticuerpo que comprende un polipéptido de fórmula (I) como se reivindica. Se conocen en la técnica muchos derivados y análogos de anticuerpos de dominio variable. Sin embargo, en la actualidad están en uso muchas partes diferentes, derivados y/o análogos de anticuerpos.

Son ejemplos no limitantes de tales partes, derivados y/o análogos, fragmentos Fv de cadena sencilla, monocuerpos, VHH, fragmentos Fab, proteínas de unión artificial tales como, por ejemplo, avímeros, y similares. Un denominador común de dichos cuerpos de unión específicos es la presencia de un dominio variable de cadena pesada. Por lo tanto se describe adicionalmente un cuerpo de unión que comprende un polipéptido de fórmula (I).

- 5 Un cuerpo de unión preferido es un anticuerpo, ya que un anticuerpo comprende una estructura de origen natural. Por lo tanto, la invención en una realización preferida proporciona un anticuerpo que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención.

10 Un cuerpo de unión es preferentemente un cuerpo de unión que está bien tolerado en un animal. La tolerancia de un animal por un polipéptido está gobernada por muchos aspectos diferentes. La inmunidad, sea mediada por linfocitos T, o mediada por linfocitos B u otra es una de las variables que están abarcadas por la tolerancia del animal por un polipéptido. Como se ha mencionado anteriormente, el anticuerpo 5D12 tiene un fondo murino. El polipéptido de fórmula (I) tiene una inmunogenicidad reducida en seres humanos. Se refiere por lo tanto en ocasiones a una variante desinmunizada del dominio variable de cadena pesada de 5D12. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una especificidad de epítipo de un anticuerpo 5D12, en el que la cadena pesada de dicho anticuerpo es un polipéptido de fórmula (I). Desinmunizado, como se usa en el presente documento, se define como menos inmunogénico en un animal que el anticuerpo original. Un polipéptido de fórmula (I) se desinmuniza en comparación con la cadena pesada en 5D12 a través de la retirada de epítipos de linfocitos T humanos conocidos. Los epítipos de linfocitos T son secuencias de aminoácidos dentro de proteínas con la capacidad para unirse a moléculas de MHC de clase II. Por la retirada de los epítipos de linfocitos T el anticuerpo es menos inmunogénico. Preferentemente un dominio variable de la invención está adicionalmente humanizado, tal como, por ejemplo, revestido. Usando técnicas de revestimiento, los restos exteriores que se detectan fácilmente por el sistema inmune se reemplazan selectivamente con restos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende una superficie revestida débilmente inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica. Un animal como se usa en la invención es preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate, más preferentemente un ser humano.

15 Un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferentemente una región constante de un anticuerpo humano. De acuerdo con diferencias en sus dominios constantes de cadena pesada, los anticuerpos se agrupan en cinco clases, o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE. Estas clases o isotipos comprenden al menos una de dichas cadenas pesadas que se nombran con una letra griega correspondiente. En una realización preferida la invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención en el que dicha región constante se selecciona del grupo de regiones constantes IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE, más preferentemente dicha región constante comprende una región constante de IgG, más preferentemente una región constante de IgG<sub>1</sub>, preferentemente una región constante de IgG<sub>1</sub> mutada, más preferentemente dicha región constante es una región constante de IgG<sub>4</sub>. Además, dicha región constante de IgG<sub>4</sub> es preferentemente una región constante de IgG<sub>4</sub> humana. Preferentemente, el anticuerpo IgG<sub>4</sub> de la invención comprende las regiones constantes de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada y ligera como se representa en la Figura 18. Preferentemente, el anticuerpo IgG<sub>4</sub> de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada y ligera que se representa en la Figura 18. Se produce cierta variación en la región constante de IgG<sub>4</sub> en la naturaleza y/o se permite sin cambiar las propiedades inmunológicas del anticuerpo resultante. Normalmente se permiten sustituciones de aproximadamente entre 1 y 5 aminoácidos en la región constante. Un anticuerpo con una región constante de IgG<sub>4</sub> o una región constante de IgG<sub>1</sub> mutada tiene al menos la mayoría de las propiedades farmacológicas de un anticuerpo pero no se une al complemento, y por lo tanto no inducirá empobrecimiento de las células a las que se une *in vivo*. Preferentemente dicha región constante es una región constante de un anticuerpo humano.

20 En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Un ácido nucleico como se usa en la invención es normalmente, pero no exclusivamente, un ácido ribonucleico (ARN) o un ácido desoxirribonucleico (ADN). Como alternativa están disponibles ácidos nucleicos para un experto en la materia, tales como, por ejemplo, ácidos péptido nucleicos (PNA). Un ácido nucleico de acuerdo con la invención está por ejemplo comprendido en una célula. Cuando dicho ácido nucleico se expresa en dicha célula, dicha célula produce un polipéptido y/o un cuerpo de unión y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la invención en una realización proporciona una célula que comprende un anticuerpo con la invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dicha célula es preferentemente una célula animal, más preferentemente una célula de mamífero, más preferentemente una célula de primate, más preferentemente una célula humana. Para los fines de la invención una célula adecuada es cualquier célula capaz de comprender y preferentemente producir un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

25 La invención proporciona además una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferentemente dicha célula produce dicho anticuerpo. En una realización preferida dicha célula es una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NS0 o una célula PER-C6<sup>TM</sup>. En una realización particularmente preferida dicha célula es una célula CHO. Se proporciona además un cultivo celular que comprende una célula de acuerdo con la invención. Diversas instituciones y compañías han desarrollado líneas celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo para uso clínico. Son ejemplos no limitantes de dichas líneas celulares, células CHO, células NS0 o células PER-C6<sup>TM</sup>. Estas células también se usan para otros fines tales como

la producción de proteínas. Las líneas celulares desarrolladas para producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan adicionalmente en el presente documento líneas celulares industriales. Por lo tanto en una realización preferida la invención proporciona el uso de una línea celular desarrollada para la producción a gran escala de proteína y/o anticuerpo para la producción del anticuerpo de la invención.

5 La invención proporciona además un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula de la invención y recoger dicho anticuerpo de dicho cultivo. Preferentemente dicha célula se cultiva en un medio sin suero. Preferentemente dicha célula se adapta para crecimiento en suspensión. Se proporciona además un anticuerpo que puede obtenerse por un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se purifica preferentemente a partir del medio de cultivo. Preferentemente dicho anticuerpo se purifica por afinidad.

10 Una célula de la invención es por ejemplo una línea celular de hibridoma, una célula CHO, una célula NS0 u otro tipo celular conocido por su idoneidad para producción de anticuerpos para fines clínicos. En una realización particularmente preferida dicha célula es una célula humana, preferentemente una célula que se transforma por una región de adenovirus E1 o un equivalente funcional de la misma. Un ejemplo preferido de dicha línea celular es la línea celular PER.C6<sup>TM</sup> o equivalente de la misma. En una realización particularmente preferida dicha célula es una célula CHO o una variante de la misma. Preferentemente una variante que hace uso de un sistema de vector de glutamina sintetasa (GS) para expresión de un anticuerpo.

20 Se ha observado que en algunos aminoácidos en las posiciones mencionadas X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> son menos adecuados para producción a alto nivel de un anticuerpo que comprende un polipéptido de fórmula (I) en una célula productora de anticuerpo. En una realización preferida un polipéptido de fórmula (I) en dicho anticuerpo comprende X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> en el que:

25 X<sub>1</sub> es L; X<sub>2</sub> es I; X<sub>3</sub> es P; X<sub>4</sub> es M; y/o X<sub>5</sub> es S. Se prefiere particularmente cuando X<sub>1</sub> es I y X<sub>2</sub> es V; X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es I; X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es L; X<sub>1</sub> es V y X<sub>2</sub> es V; X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es L; o X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es V. Estos últimos polipéptidos se prefieren particularmente en combinación en la que una X<sub>3</sub> es P; X<sub>4</sub> es M; y X<sub>5</sub> es F o S, preferentemente S; en una realización la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la invención, en el que: X<sub>1</sub> es L; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es L; X<sub>4</sub> es L y X<sub>5</sub> es F.

La producción de anticuerpos que comprenden dicho polipéptido es buena, proporcionando simultáneamente propiedades inmunológicas mejoradas en seres humanos en comparación con ch5D12.

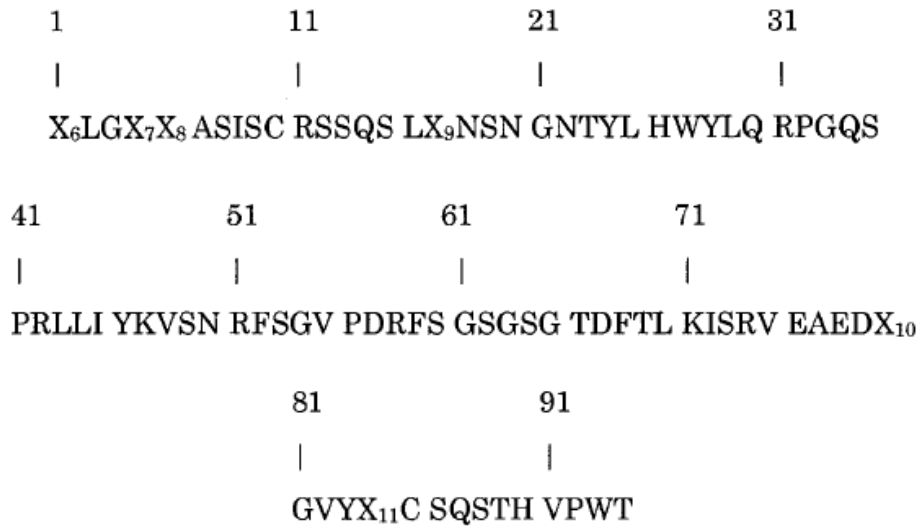
30 También se describe una región variable de cadena pesada en la que al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> es el mismo que un aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia que se muestra por la invención que produce niveles de expresión específicamente buenos y en la que además al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> es el mismo que un aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de 5D12. Una ventaja de un polipéptido en el que al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> es el mismo que un aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de 5D12, es que un cuerpo de unión que comprende dicho polipéptido muestra un mejor nivel de expresión que un polipéptido en el que ninguno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> o X<sub>5</sub> es el mismo que un aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de 5D12. Sin quedar ligado por la teoría, se cree que dicho mejor nivel de expresión se debe al hecho de que un aminoácido en la posición de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y/o X<sub>5</sub> contribuye a un ensamblaje apropiado de un cuerpo de unión cuando dicho aminoácido es el mismo que un aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de 5D12.

45 Un anticuerpo que comprende un polipéptido de fórmula (I) muestra actividad antagonista no estimuladora. Ya que la interacción CD40L-CD40 está implicada en la patofisiología de diversos trastornos inflamatorios tales como enfermedades autoinmunes y rechazo de injertos, un polipéptido de acuerdo con la invención es por lo tanto particularmente adecuado para aliviar un síntoma de un trastorno inflamatorio. En una realización un anticuerpo que comprende un cuerpo de unión de la invención es un anticuerpo monoclonal. La tecnología de anticuerpos monoclonales posibilita la producción de grandes cantidades de anticuerpos esencialmente puros, obteniendo de este modo productos predecibles. Por lo tanto, la invención en una realización proporciona un anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 humano que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención. Un cuerpo de unión de acuerdo con la invención es más adecuado para ese fin puesto que está en una realización desinmunizada en comparación con un 5D12 de ratón y/o un 5D12 quimérico. Por lo tanto, un cuerpo de unión de la invención tiene una inmunogenicidad reducida y una semivida potenciada en seres humanos en comparación con un 5D12 de ratón y/o un 5D12 quimérico. Como resultado del mismo, un cuerpo de unión de la invención tiene un potencial farmacéutico sostenible frente a diversos trastornos inflamatorios. Por lo tanto, en una realización preferida la invención proporciona un anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 humano desinmunizado de acuerdo con la invención.

55 Como se ha hecho referencia anteriormente, la presente invención proporciona moléculas de tipo 5D12 que comprenden alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de 5D12, en las que las alteraciones son al menos en el dominio variable de cadena pesada y preferentemente también en el dominio variable de cadena ligera. En este contexto la invención describe además un cuerpo de unión que comprende una

# ES 2 406 163 T3

secuencia de aminoácidos de fórmula (II)



en la que:

- 5 X<sub>6</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;  
X<sub>7</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;  
X<sub>8</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;  
X<sub>9</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;  
X<sub>10</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y  
10 X<sub>11</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H.

Dicho cuerpo de unión es preferentemente un anticuerpo monoclonal antagonista anti-CD40 humano de acuerdo con la invención. Una X seleccionada de X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub> o X<sub>11</sub> se selecciona de un grupo que se asemeja a un aminoácido en una posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos 5D12 y/o que se asemeja a un aminoácido en una posición correspondiente en una secuencia que se muestra por la invención que produce buenos niveles de expresión, como se muestra en el ejemplo 2. Por lo tanto, un cuerpo de unión como se describe en el presente documento preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (II) en la que:

- 15 X<sub>6</sub> es N, Q, S, T, Y, W o C;  
X<sub>7</sub> es D, E, N, Q, S, T, Y, W o C;  
X<sub>8</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C;  
20 X<sub>9</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;  
X<sub>10</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M; y  
X<sub>11</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C.

En otra realización la invención proporciona un anticuerpo monoclonal antagonista anti-CD40 humano de acuerdo con la invención que comprende un polipéptido de fórmula (II) de la invención que comprende una secuencia de aminoácidos como la siguiente.

25



1	11	21	31
<b>ELQLT QSPLS LPVX<sub>6</sub>L GX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>AS ISCRS SQSLX<sub>9</sub> NSNGN TYLHW</b>			
41	51	61	71
<b>YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI</b>			
81	91	101	111
<b>SRVEA EDX<sub>10</sub>GV YX<sub>11</sub>CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR.</b>			

5 En una realización preferida la invención proporciona un anticuerpo como se reivindica que comprende un polipéptido de fórmula (II) de la invención en el que X<sub>6</sub> es T o S, X<sub>7</sub> es D o Q, X<sub>8</sub> es Q o P, X<sub>9</sub> es V o A, X<sub>10</sub> es V o L y X<sub>11</sub> es F o Y. Más preferentemente en el que: X<sub>6</sub> es T, X<sub>7</sub> es Q, X<sub>8</sub> es P, X<sub>9</sub> es A, X<sub>10</sub> es V y X<sub>11</sub> es Y. Los anticuerpos de tipo 5D12 que comprenden un polipéptido de fórmula (I) y el polipéptido preferido de fórmula (II) combinan buenos niveles de expresión en una célula productora con buenas propiedades de tolerancia y propiedades farmacodinámicas en un ser humano.

10 Un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de fórmula (I) y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de fórmula (II) como se reivindica. Dicho anticuerpo tiene buenas características. Es posible, por supuesto, generar variantes de dicho anticuerpo original modificando uno o más aminoácidos del mismo. Muchas de tales variantes se comportarán de forma más o menos similar en comparación con dicho original. Dichas variantes también se describen en el presente documento. Existen muchas maneras de modificar un anticuerpo de la invención. Un ejemplo no limitante de dicha modificación es un anticuerpo que comprende un piro-glutamato en lugar de un glutamato. Otros ejemplos no limitantes de dichas modificaciones son una inserción, delección, inversión y/o sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con dicho anticuerpo original. La presente invención proporciona medios y procedimientos para generar dicha variante. También proporciona ensayos para determinar las características de dicha variante. También se describe una variante de un anticuerpo original de la invención, comprendiendo dicha variante una inserción, delección, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 10 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de dicho anticuerpo original. Preferentemente dicha inserción, delección, inversión y/o sustitución no comprende los aminoácidos en la posición X<sub>1</sub> y posición X<sub>2</sub> del dominio variable de cadena pesada de fórmula (I) del anticuerpo original.

25 La invención proporciona un procedimiento para seleccionar un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano que comprende generar una primera línea celular que produce un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano original y determinar la cantidad de anticuerpo original que se produce por dicha primera línea celular, comprendiendo dicho anticuerpo original la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

1	11	21	31
<b>ELQLT QSPLS LPV T L G Q P AS ISCRS SQSL A NSNGN TYLHW</b>			
41	51	61	71
<b>YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI</b>			
81	91	101	111
<b>SRVEA ED V GV Y Y CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR</b>			

y la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada

1	11	21	31
<b>QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX<sub>1</sub>S RYSVY WX<sub>2</sub>RQP</b>			
41	51	61	71
<b>PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK</b>			
81	91	101	111
<b>SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS</b>			

- 5 en la que  $X_1$  y  $X_2$  se seleccionan por parejas del grupo que consiste en  $X_1 = I$  y  $X_2 = I$  y  $X_2 = V$ ;  $X_1 = L$  y  $X_2 = I$ ;  $X_1 = V$  y  $X_2 = V$ ,  $X_1 = L$  y  $X_2 = L$  o  $X_1 = L$  y  $X_2 = V$ , comprendiendo dicho procedimiento además
- 10 generar al menos una línea celular adicional que produzca una variante de dicho anticuerpo original en la que dicho anticuerpo variante sea un anticuerpo original modificado que comprende una inserción, deleción, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos en comparación con dicho anticuerpo original, en el que dicha modificación no consiste en una modificación de los aminoácidos en la posición o las posiciones identificadas por  $X_1$  y  $X_2$ , y determinar la cantidad de anticuerpo variante que se produce por dicha al menos una línea celular adicional,
- 15 comprendiendo dicho procedimiento además seleccionar un anticuerpo variante que se produjo a una cantidad que era de al menos el 50 % de la cantidad de anticuerpo original.
- 20 Dicha inserción, deleción, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos puede ser en cualquier parte del anticuerpo que no sea o implique a los aminoácidos en las posiciones  $X_1$  y  $X_2$ . Preferentemente, dicha inserción, deleción, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos en dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada o dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cadena correspondiente en dicho anticuerpo original. Preferentemente dicha
- 25 inserción, deleción, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos es en dicha secuencia de aminoácido de cadena pesada en comparación con dicha secuencia de cadena pesada de dicho anticuerpo original. Preferentemente dicho procedimiento comprende además generar una línea celular productora de anticuerpos que produzca dicho anticuerpo seleccionado. Esta línea celular productora puede ser dicha línea celular adicional u otra línea celular más que produzca dicho anticuerpo seleccionado. Preferentemente dicho procedimiento comprende además recoger dicho anticuerpo seleccionado. La invención proporciona además un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano aislado y/o recombinante que puede obtenerse por un procedimiento de acuerdo con la invención.

También se describe un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano que comprende una modificación de la secuencia de aminoácido de cadena pesada

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX <sub>1</sub> S RYSVY WX <sub>2</sub> RQP			
41	51	61	71
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS			

5 en la que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan por parejas del grupo que consiste en X<sub>1</sub> = I y X<sub>2</sub> = V, X<sub>1</sub> = L y X<sub>2</sub> = I, X<sub>1</sub> = V y X<sub>2</sub> = V, X<sub>1</sub> = L y X<sub>2</sub> = L; o X<sub>1</sub> = L y X<sub>2</sub> = V,

comprendiendo dicha modificación una inserción, deleción, inversión, y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada y en la que dicha modificación no consiste en una modificación de los aminoácidos en la posición o las posiciones identificadas por X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>

10 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o una célula de acuerdo con la invención. Además, la invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o una célula de acuerdo con la invención para uso como un medicamento. Preferentemente un medicamento para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio y/o para reducir el rechazo de injertos y/o o para el tratamiento de cánceres positivos para CD40. En una realización preferida dicho trastorno autoinmune y/o uno inflamatorio se selecciona del grupo de enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, penfigoide ampollar y dermatitis atópica.

20 Como un polipéptido como se describe en el presente documento es particularmente adecuado para aliviar un síntoma de un trastorno inflamatorio debido a sus propiedades antagonistas de CD40 no estimuladoras, un polipéptido como se ha descrito es adecuado para aliviar un síntoma de varios trastornos. Un trastorno inflamatorio como se usa en la invención se define como cualquier enfermedad que implique un componente inflamatorio. Para el interés de la invención, un trastorno inflamatorio incluye específicamente un trastorno autoinmune y/o rechazo de injertos. El papel central de la interacción CD40-CD40L en el inicio, amplificación y prolongación de respuestas inmunitarias hace a un polipéptido como se ha descrito específicamente adecuado para modulación inmune en un trastorno autoinmune.

30 Posteriormente en el presente documento se proporciona información sobre CD40 y CD40L para ilustrar el papel de CD40 y su ligando en trastornos inflamatorios. La molécula CD40 es una glicoproteína de membrana de tipo I de 50 kDa y se expresa en linfocitos B, monocitos/macrófagos y células dendríticas (DC)<sup>45-50</sup>. Además, en condiciones patológicas puede encontrarse CD40 en células endoteliales (CE), fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos<sup>51</sup>. El ligando de CD40 (gp39, TBAM, TRAP, CD40L, CD154), una glicoproteína de membrana integral de tipo II de 32 kDa, se expresa de forma transitoria en linfocitos T CD4+ activados y una pequeña población de linfocitos T CD8+ activados<sup>52,53</sup>. Además, se ha descubierto CD40L en varios otros tipos celulares después de activación, incluyendo mastocitos, basófilos, linfocitos B, eosinófilos, DC y plaquetas<sup>54,55</sup>.

35 La interacción de CD40 con CD40L desencadena varios acontecimientos biológicos en linfocitos B incluyendo proliferación, expresión de marcadores de activación, producción de inmunoglobulina (Ig), cambio de isotipo, adhesión homotípica y rescate de apoptosis<sup>56,57</sup>. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la distribución de la molécula CD40 no se restringe a linfocitos B como se postuló originalmente. Los monocitos humanos recién aislados expresan niveles bajos de la molécula CD40, que puede regularse positivamente por cultivo en presencia de IFN- $\gamma$ <sup>47-49,58</sup>. La ligación de CD40 de monocitos/macrófagos induce la secreción de grandes cantidades de mediadores proinflamatorios tales como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12, que inducen respuestas inflamatorias y actividad tumoricida<sup>47-49,58</sup>, y las rescata de apoptosis<sup>48</sup>. La ligación de CD40 también provoca que las DC potencien su diferenciación y activación, para potenciar la expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD86, CD80 y

CD58, para aumentar la producción de citocinas, y para inhibir la apoptosis<sup>50,59</sup>. Además, cuando se expresa en condiciones inflamatorias, la señalización de CD40 puede inducir expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y selectina E en CE<sup>55</sup>. Estos resultados sugieren que la señalización a través de CD40 durante las interacciones de linfocitos T-CE puede ser una etapa importante en la regulación de la activación de CE y reclutamiento de leucocitos en tejidos no linfoides. Los estudios *in vivo* han indicado la importancia de las interacciones CD40-CD40L en la generación de respuestas inmunes humorales<sup>60,61</sup>, en la sensibilización y activación de linfocitos T específicos de antígeno<sup>62</sup>, en la activación temporal de macrófagos<sup>63</sup>, así como en las respuestas inmunes mediadas por células protectoras a través de la activación de macrófagos mediada por linfocitos T contra infecciones parasitarias intracelulares tales como *Pneumocystis*, *Cryptosporidium* y *Leishmanias*<sup>64-66</sup>.

Se demuestra un papel específico para CD40 y su ligando en modelos murinos de enfermedad autoinmune. Los estudios de modelos animales han indicado claramente la implicación de la interacción CD40L-CD40 en la patofisiología de diversas enfermedades autoinmunes. En estos estudios, usando ratones que padecían enfermedades autoinmunes espontáneas o experimentales, la interferencia con interacciones CD40L-CD40 tuvo efectos beneficiosos claros. Se mostró que un mAb para CD40L murino evita o reduce síntomas de enfermedad en artritis inducida por colágeno, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE; un modelo animal para EM), en ratones con lupus (SWR x NZB) F1 y en ratones diabéticos no obesos (NOD) que desarrollan espontáneamente diabetes autoinmune dependiente de linfocitos T. Las pruebas indican que las interacciones CD40-CD40L también desempeñan un papel en la patogénesis de enfermedades inflamatorias del intestino, que incluyen enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Se mostró que los ratones transgénicos para CD40L con alto número de copias del transgén adquirirían enfermedad inflamatoria del intestino letal marcada por infiltración de células CD40<sup>+</sup> y linfocitos T CD40L<sup>+</sup> en tejidos enfermos<sup>67</sup>. El mAb anti-CD40L previno eficazmente la inflamación de la mucosa y producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la lámina propia en animales con colitis que se habían inducido por ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico<sup>44</sup>. Muy recientemente se realizó una comparación directa entre el tratamiento anti-TNF- $\alpha$  y la interferencia de la ruta CD40-CD40L usando un mAb anti-CD40L en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino experimental de ratón SCID. En este modelo, se inyectan células CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>allo</sup> singénicas en ratones SCID que desarrollan posteriormente diarrea o heces blandas y muestran pérdida de peso progresiva comenzando 3-5 semanas después de la reconstitución de linfocitos T, como síntomas de la enfermedad inflamatoria del intestino experimental. El tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  o anti-CD40L desde el día de la reconstitución de linfocitos T evitó completamente la apariencia clínica e histológica de enfermedad inflamatoria del intestino experimental. Además, la administración anti-CD40L desde la semana 5 después de la reconstitución de linfocitos T aún pudo prevenir la progresión de la enfermedad y los animales tratados mostraron mejora en síntomas de enfermedad e histología en comparación con animales de control (observaciones no publicadas).

Los trabajos recientes han demostrado también que la interferencia con la ruta CD40-CD40L es fuertemente inmunosupresora en modelos de trasplante. El tratamiento combinado con linfocitos pequeños alogénicos o linfocitos pequeños con linfocitos T agotados más un anticuerpo para CD40L de ratón permitió la supervivencia de aloinjertos de islotes pancreáticos indefinidos en 37 de 40 receptores que diferían en loci de histocompatibilidad mayores y menores<sup>68</sup>. A partir de estos experimentos se concluyó que la interferencia eficaz de la interacción CD40L-CD40 muy probablemente había dado como resultado la prevención de inducción de moléculas coestimuladoras en los linfocitos en reposo pequeños por los linfocitos T huéspedes alorreactivos. En otro estudio reciente, se demostró que la administración de un mAb para CD40L de ratón en el momento del trasplante prolongó notablemente la supervivencia de aloinjertos cardíacos murinos completamente diferentes en huéspedes tanto sin tratar como sensibilizados. Sin embargo, cuando se retrasó la terapia anti-CD40L hasta el día postoperatorio 5, anti-CD40L no consiguió prolongar la supervivencia del injerto. A partir de este estudio, se concluyó que la terapia anti-CD40L inhibía el rechazo de aloinjertos principalmente interfiriendo con la ayuda de linfocitos T para funciones efectoras. Se ha mostrado además que la interferencia con las rutas CD80/CD86-CD28 y CD40-CD40L anula eficazmente de forma simultánea la expansión clonal de linfocitos T *in vitro* e *in vivo*, promueve la supervivencia a largo plazo de injertos cutáneos completamente alogénicos, e inhibe el desarrollo de rechazo vascular crónico de aloinjertos cardíacos principalmente vascularizados. Además, la interferencia con una ruta CD40-CD40L, opcionalmente en combinación con la interferencia con una ruta CD80/CD86-CD28, evita el rechazo de aloinjertos de riñón en un modelo de aloinjerto de riñón de mono rhesus<sup>69,70</sup>. Para información adicional sobre los efectos de 5D12 en trastornos inflamatorios, véase, por ejemplo, referencias<sup>71-81</sup>.

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central (cerebroespinal). En este trastorno, la materia blanca que rodea las fibras nerviosas se endurece. La expresión esclerosis múltiple (EM) significa literalmente "muchas cicatrices". Las áreas endurecidas del tejido nervioso se llaman placas. Los síntomas, gravedad y curso de la esclerosis múltiple son altamente variables, dependiendo parcialmente de los sitios de las placas y el alcance del deterioro de la materia blanca. El deterioro de la materia blanca en el sistema nervioso ralentiza los impulsos nerviosos lo que conduce a descoordinación del sistema nervioso.

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en el mono tití común (*Callithrix jacchus*) es un modelo preclínico útil de esclerosis múltiple (revisado en<sup>86,87,102,104</sup>). Las lesiones de materia blanca del sistema nervioso central (SNC) que se desarrollan en las diversas versiones de este modelo de EAE comparten características patomorfológicas, radiológicas e inmunológicas con EM<sup>95,98,101</sup>. Por lo tanto, el modelo de EAE de tití puede rellenar el amplio hueco

inmunológico entre humanos y roedores que dificulta la selección de tratamientos prometedores en los proyectos de desarrollo de fármacos en un estadio preclínico<sup>96,99,103</sup>.

Los titís inmunizados con rhMOG, una proteína recombinante que representa el fragmento extracelular de MOG humana (aminoácidos 1-125) desarrollan EAE en el 100 % de los casos, lo que se debe a la presencia del elemento de susceptibilidad a MHC de clase II monomórfico caja DRB\*W1201 en el repertorio de cada mono<sup>82,84,85,107</sup>. Un aspecto particularmente útil de este modelo para desarrollo de terapias es que las lesiones que se desarrollan en la materia blanca del cerebro pueden visualizarse y caracterizarse tentativamente con técnicas de captura de imágenes por resonancia magnética clínicamente relevantes<sup>92,105</sup>. El análisis longitudinal de las lesiones de materia blanca del cerebro con imágenes de resonancia magnética (IRM) mostró un incremento progresivo del volumen y actividad inflamatoria persistente en la mayoría de las lesiones. Además, la caracterización de la patología del SNC con IRM y criterios histológicos previamente descritos<sup>101</sup> reveló que la mayoría de las lesiones están en un estadio temprano activo<sup>106</sup>.

El modelo de EAE inducido por rhMOG se ha usado para ensayar si los anticuerpos que se dirigen a moléculas coestimuladoras de células presentadoras de antígenos (APC) y linfocitos T son un tratamiento potencial para EM. La interacción de CD40 con su ligando CD154 desempeña un papel importante en diversos procesos inmunopatogénicos que actúan en EAE, incluyendo activación de linfocitos B, activación de células presentadoras de antígenos (APC), inicio de respuestas de linfocitos T específicas de antígeno e inducción de funciones efectoras de macrófago<sup>90,93,97,7</sup>. Un estudio realizado en 1996 confirmó que los ratones tratados con un anticuerpo contra CD154 se protegen contra EAE<sup>88</sup>. Sin embargo, se detuvo un ensayo clínico en pacientes con EM con anticuerpo contra CD154 debido a efectos secundarios inesperados que no se observaron en los experimentos animales<sup>17</sup>.

El anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón 5D12 (mu5D12) se ha inducido contra CD40 humano. El anticuerpo 5D12 pareció ser un inhibidor potente de activación mediada por CD40-CD40L en varios tipos celulares y, a diferencia de la mayoría de los otros mAb anti-CD40, no ejerce actividad estimuladora de CD40<sup>21,22,39</sup>. Tanto el anticuerpo anti-CD40 humano de ratón mu5D12 como la versión quimérica de este anticuerpo, ch5D12, presentaron fuertes efectos supresores en el desarrollo de lesiones de materia blanca del SNC y déficit neurológico en el modelo de EAE de tití y no mostraron efectos secundarios notables<sup>23,24</sup>. Los mismos estudios mostraron que mAb anti-CD40 inyectado por vía intravenosa en titís comunes afectados por EAE puede conseguir acceder a lesiones de la materia blanca del cerebro en las que se expresan prominentemente moléculas CD40 en macrófagos infiltrados y microglía activada<sup>95</sup>, como se descubrió antes en EM<sup>88</sup>. Esto ha planteado la pregunta de si ch5D12 también tiene un efecto terapéutico en lesiones ya existentes.

t Hart y col. supervisaron el desarrollo de lesiones cerebrales en 7 monos inmunizados con rhMOG por imágenes de resonancia magnética (IRM) en serie a intervalos de 2 semanas<sup>76</sup>. Los resultados de este estudio demostraron la supresión de la inflamación de la lesión en los 3 monos tratados con ch5D12 mientras que se redujo el agrandamiento de la lesión de 2 de los 3 monos tratados con ch5D12.

La prevención de la interacción de CD40 con su ligando CD154 en linfocitos T activados en un momento temprano del proceso de enfermedad ha tenido un impacto significativo en la expresión clínica y neuropatológica de EAE en roedores<sup>88,89,91,94,100</sup> y modelos de primates no humanos<sup>23,24</sup>. CD40 se expresa prominentemente dentro de las lesiones de materia blanca del SNC de pacientes con EM así como roedores afectados de EAE<sup>88</sup> y primates no humanos<sup>95</sup>. Se ha mostrado de forma elegante en ratones quiméricos para médula ósea<sup>83</sup> que las APC que portan CD40 dentro del SNC, tales como macrófagos infiltrados así como células gliales perivasculares y parenquimales, contribuyen significativamente a la patogénesis de EAE.

Los resultados de t Hart y col, Laman y col, y Boon y col.<sup>76,79,81</sup> indican que el bloqueo por anticuerpos de CD40 es un tratamiento potencialmente eficaz de EM. Resulta importante que el mAb ch5D12 no tiene efectos secundarios aparentes en el modelo de EAE de tití ni en otras especies de primates<sup>80</sup>. El efecto clínico beneficioso de anticuerpo anti-CD40 se demostró en experimentos controlados con placebo en dos modelos de EAE en titís, concretamente inducidos con mielina humana<sup>79</sup> o rhMOG<sup>81</sup>. Además, t Hart y col. han mostrado un efecto inhibitorio de tratamiento con anticuerpo anti-CD40 en lesiones ya existentes<sup>76</sup>.

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria que afecta al 1-2 % de la población. En esta enfermedad, los linfocitos T y queratinocitos en las lesiones se activan y expresan marcadores de activación y moléculas coestimuladoras. Se cree que algunas moléculas coestimuladoras expresadas en queratinocitos y linfocitos T interactúan entre sí y que estas interacciones contribuyen a la actividad de la enfermedad<sup>108-110</sup>. Un conjunto tal de moléculas puede ser CD40, que se expresa en queratinocitos activados y CD154 (ligando de CD40), que se expresa de forma transitoria en linfocitos T CD4+ activados. La ligación CD40-CD154 entre linfocitos T y queratinocitos puede liberar estos mediadores inflamatorios de células que se ven en abundancia en lesiones psoriásicas. Se han revisado recientemente CD40, CD154, y las interacciones CD40 y CD154<sup>111</sup>.

Los queratinocitos cultivados también expresan CD40; la expresión también se potencia por tratamiento con IFN. La ligación de CD40 altamente expresado en queratinocitos tratados con IFN-gamma (denominados queratinocitos CD40++ a largo del presente artículo) con CD154 da como resultado regulación positiva de ICAM y aumento de la producción de citocinas 112-114.

Hasta la fecha, solo ha aparecido un informe que implique a esta ligación en la patogénesis de psoriasis<sup>113</sup>. Los tipos celulares que expresan CD40 en lesiones psoriásicas no se identificaron en este último estudio y no se ha descrito su incidencia y estado lesional. La presencia de linfocitos T CD154+ en lesiones psoriásicas tampoco se ha estudiado. Además, sigue sin conocerse si CD154 actúa como una de las señales para la producción por queratinocitos de quimiocinas y complemento, que se encuentran en abundancia en lesiones psoriásicas<sup>115</sup>.

Pasch y col. demostraron recientemente la presencia y localización de células CD40+ y CD154+ por inmunohistoquímica en piel con lesión y sin lesión de diez pacientes con psoriasis<sup>116</sup>. Se observó positividad aumentada para CD40 en grupos de queratinocitos y se mostró alta expresión de CD40 en casi todas las células de Langerhans CD1a+ en epidermis normal, con lesión y sin lesión. Además, está presente alta expresión de CD40 en casi todas las células CD83+ en lesiones psoriásicas; se vieron en pocas ocasiones en piel sin lesión y normal<sup>116</sup>. Además, una proporción pequeña de linfocitos T mostró expresión de CD154, en la mayoría de los pacientes en yuxtaposición con células CD40+. Estos resultados presentan la posibilidad de que los linfocitos T CD154+ puedan ligarse con queratinocitos CD40+, células de Langerhans y células dendríticas CD83+, y liberar mediadores de ellos en la lesión.

Además, demostraron que la ligación de CD40 induce la liberación de quimiocinas (IL-8, RANTES y MCP-1)<sup>116</sup>. En la misma publicación, Pasch y col. mostraron que la liberación relacionada con CD40 de las quimiocinas IL-8, MCP 1 y en menor grado RANTES se inhibió por el anticuerpo antagonista anti-CD40 5D12<sup>116</sup>. Estos datos sugieren que el mAb antagonista anti-CD40 5D12 puede al menos en parte tener un efecto en la inflamación vista en lesiones psoriásicas.

El documento US2003/0165499 desvela un efecto antipsoriásico medible del 5D12 y otros anticuerpos antagonistas anti-CD40 en un sistema de modelo de trasplante xenogénico de ratón SCID que se usa como un modelo para tratamiento de psoriasis, que muestra que los anticuerpos antagonistas anti-CD40 pueden usarse para el tratamiento de psoriasis. Se demostró un efecto terapéutico de 5D12 en este sistema *in vivo*.

En una realización particularmente preferida dicho trastorno autoinmune y/o uno inflamatorio comprende enfermedad inflamatoria del intestino. En otra realización preferida, se proporciona un uso de la invención en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino comprenda colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD).

Como se ha ilustrado anteriormente, un polipéptido de acuerdo con la invención es adecuado para el tratamiento de diversos trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos autoinmunes y rechazo de injertos. Por lo tanto, la invención en una realización proporciona un procedimiento para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio y/o para reducir el rechazo de injertos. En una realización adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o una célula de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio y/o para reducir el rechazo de injertos. Aliviar un síntoma como se usa en la invención se define como aliviar al menos un síntoma de un trastorno al menos parcialmente. La invención es de interés específico para trastornos autoinmunes y/o inflamatorios para los que no existe en la actualidad ningún tratamiento eficaz. Son ejemplos de estos trastornos artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, penfigoide ampollar, y dermatitis atópica. Un polipéptido como se describe en el presente documento, opcionalmente comprendido en un cuerpo de unión como se describe o una célula de la invención y/o codificado por un ácido nucleico de la invención, es especialmente adecuado para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o inflamatorio ya que las propiedades definidas de un polipéptido como se describen posibilitan la interferencia en una ruta CD40-CD40L de una manera específica. Además, puesto que un cuerpo de unión como se describe está preferentemente desinmunizado, un cuerpo de unión como se describe está presente durante un período de tiempo prolongado y por lo tanto muestra su actividad antagonista en un paciente durante un período de tiempo considerable. Por lo tanto, la invención en una realización proporciona un uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o una célula de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio y/o para reducir el rechazo de injertos, en el que dicho trastorno autoinmune y/o dicho inflamatorio se selecciona del grupo de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, penfigoide ampollar y dermatitis atópica.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La concentración en suero de ch5D12 después de una única administración el día 0 a los cuatro niveles de dosis como se indica por los símbolos. Los valores se proporcionan como  $\mu\text{g}$  de ch5D12/ml de suero y se determinaron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas como se detalla en la Referencia<sup>27</sup>.

Figura 2. Cambios en las puntuaciones del índice de actividad de enfermedad de Crohn (CAI) durante el período de 28 días después de la infusión de ch5D12. El área sombreada indica el período en el que los niveles de ch5D12 exceden la concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  (véase también Figura 1) que se descubrió que era un nivel en suero antagonista funcional en primates<sup>24-27</sup>. En la cohorte de  $0,3 \text{ mg/kg}$ , los niveles en suero nunca excedieron el nivel de  $10 \mu\text{g/ml}$ .

- Figura 3. Puntuaciones de actividad de enfermedad histológica el día 0 y día 28. La puntuación de actividad máxima es 16 y la puntuación de actividad se realizó de acuerdo con la Referencia<sup>40</sup>. Se obtuvieron muestras del íleon (rombos) de nueve sujetos y muestras del colon (cuadrados) de 11 sujetos el día 0 y día 28 y los resultados se presentan por nivel de dosis de ch5D12 [(a) 0,3 mg/kg, (b), 1,0 mg/kg, (c), 3,0 mg/kg y (d), 10,0 mg/kg].
- Figura 4. Se muestran biopsias de colon del paciente 012 (3,0 mg/kg) y biopsias del íleon del paciente 011 (3,0 mg/kg) como ejemplos para la reducción de la respuesta inflamatoria. Las muestras se tiñeron con anticuerpos que reconocen todos los linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD19), macrófagos (CD68) y células CD40 (+) antes (a, c) y el día 28 después de la administración de ch5D12 (b, d). HE, hematoxilina-eosina.
- Figura 5. Secuencia de ADN consenso y de aminoácidos deducida de la región VH y VL de 5D12 murino.
- Figura 6. Comparación de aminoácidos de las regiones V murinas con regiones V revestidas y desinmunizadas de 5D12.
- Figura 7. Alineamiento de las 12 variantes de aminoácidos ensayadas (Q5E, K13A, E16Q, T17S, 129L, 137V, P45L, M48L, STS60NSA, T68S, S79F y T108S) de VH de 5D12 desinmunizado en comparación con la secuencia murina parental (ch5D12) y la secuencia completamente desinmunizada (DI5D12).
- Figura 8. Análisis de FACS usando células JY. El sobrenadante de células PER.C6 de las variantes expresadas transitorias (Q5E, K13A, E16Q, T17S, 129L, 137V, P45L, M48L, STS60NSA, T68S, S79F y T108S) de 5D12 se recogió después de 48 horas. Como control también se recogió sobrenadante de células transfectadas con ch5D12 o DI5D12 junto con sobrenadante de células transfectadas con simulación (sin plásmido). La unión de anticuerpos expresados se ensayó por FACS usando células JY junto con un anticuerpo secundario marcado con FITC anti-humano (1/100 diluido). Como control de FACS se incubaron células JY solamente con el anticuerpo marcado con FITC secundario.
- Figura 9. Alineamiento de las variantes V-L-I adicionales en las posiciones 29 y 37 (29I-37V, 29V-37I, 29I-37L, 29V-37V, 29L-37L, 29V-37L, 29L-37V) de VH de 5D12 desinmunizada en comparación con la secuencia quimérica parental (ch5D12), la secuencia completamente desinmunizada (DI5D12; 29I-37I) y PG102 (29L-37I).
- Figura 10. Distribución de la productividad de anticuerpos para las líneas celulares GS-CHO que producen el anticuerpo PG102 y cultivos en placa de 24 pocillos con "crecimiento excesivo". El número de líneas celulares se representa en el eje X, los intervalos de concentración de anticuerpos se representan en el eje Y (los intervalos de concentración de anticuerpos se distribuyen en grupos ascendentes comenzando a 0-25 µg/ml).
- Figura 11. Perfiles de crecimiento y acumulación de anticuerpos para líneas celulares A) L107 (DC1; panel superior), b) L25 (DC2; panel medio) y C) M95 (DC3, panel inferior) en cultivo de matraz de agitación semicontinuo CDACF.
- Figura 12. Comparación de la unión de PG102 (rojo) y ch5D12 (PG100) (azul) a 10 µg/ml con CD40 inmovilizado en 3 niveles diferentes.
- Figura 13. Inhibición de la unión de mAb de CD40 con células JY que expresan CD40 humano por el mAb anti-idiotipo 173-36-1. Los mAb anti-CD40 se ensayaron a una concentración de 1 µg/ml. Los datos indican la media ± e.t. de la media de 4 determinaciones separadas para cada anticuerpo.
- Figura 14. ELISA de CD40-Fc. Unión relacionada con la concentración de ch5D12 (PG100) y PG102 con CD40-Fc humano. Las placas se revistieron durante una noche con CD40-Fc humano 250 ng/ml. El mAb de control de isotipo, chFUN-1, se dirige contra CD86 humano. Los datos indican la media ± e.t. de la media (todos n = 3).
- Figura 15. Cuantificación por FACS de la unión de mAb anti-CD40 con células JY. ch5D12 (PG100) y PG102 presentaron concentraciones de unión semi-máximas comparables. El mAb anti-CD86, chFUN-1, también mostró unión con células JY en estos experimentos debido a la expresión en superficie de CD86 humano por esta línea celular. Los datos indican la media de determinaciones por duplicado para cada anticuerpo.
- Figura 16. Inhibición de la unión de ch5D12 (PG100)-PE y PG102-PE con células JY por anticuerpos de ch5D12 (PG100) y PG102 no marcados. ch5D12 (PG100) (A) y PG102 (B) marcados se incubaron a 1 µg/ml en presencia de concentración creciente de anticuerpo no marcado competidor. Se determinó la unión del anticuerpo marcado como intensidad de fluorescencia media (IFM) por citometría de flujo. La IFM máxima para la unión de ch5D12 (PG100) PE y PG102PE fue de 369 unidades de fluorescencia (A) y 305 unidades de fluorescencia (B), respectivamente. Los datos indican la media ± e.t. de la media de 4 experimentos separados.
- Figura 17. Inhibición de la liberación de IL-8 por células THP-1 después de cultivo conjunto con células Jurkat. Se cultivaron conjuntamente células THP-1, pulsadas con IFN $\gamma$ , con células Jurkat en presencia de concentraciones crecientes de ch5D12 (PG100) o PG102. La liberación de IL-8 de células THP-1, inducida por unión de células Jurkat con células THP-1 mediante CD40-CD40L, se midió por ELISA. Los datos indican el

resultado de un único experimento.

Figura 18. Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de una cadena pesada y ligera de IgG<sub>4</sub> PG102.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 *Materiales y procedimientos*

Se seleccionaron para inclusión en el estudio dieciocho sujetos adultos (18-60 años de edad) con un diagnóstico clínico de enfermedad de Crohn confirmado por pruebas radiológicas, endoscópicas o histológicas, y con una puntuación de índice de actividad de enfermedad de Crohn (CDAI) de al menos 220 pero no más de 450 (puntuado durante 7 días antes de la administración del fármaco del estudio). Se permitió a los sujetos tener los siguientes tratamientos antes y durante el estudio: tratamiento con mesalamina durante 8 o más semanas, permaneciendo la dosis estable durante las 4 semanas antes de la exploración; un máximo de 30 mg de corticosteroides por día (o 9 mg de budesonida por día) durante 8 o más semanas, permaneciendo la dosis estable 2 semanas antes de la exploración; mercaptopurina o azatioprina durante 4 o más meses, permaneciendo la dosis estable durante 8 semanas antes de la exploración. Los sujetos no pudieron haber recibido tratamiento con ciclosporina A o metotrexato en un período de 3 meses antes de la exploración ni se les permitió haber tenido exposición previa a tratamiento con mAb. La edad media de todos los sujetos admitidos fue de 35,8 años de los que siete fueron hombres y 11 fueron mujeres. Todos los sujetos eran de etnia caucásica. No se observaron diferencias aparentes entre pacientes en las diferentes cohortes en la inclusión (Tabla 1), con la excepción de que en los tres grupos con menor dosis la mayoría de los sujetos eran mujeres, mientras que el grupo con mayor dosis (10,0 mg/kg) consistía solamente en sujetos masculinos. No hubo diferencias notables entre las cuatro cohortes con respecto al electrocardiograma de línea basal (ECG), signos vitales, exámenes físicos, historial de señales y síntomas de enfermedad de Crohn y valores de laboratorio de línea basal. No hubo diferencias significativas con respecto a características de la línea basal entre las cuatro cohortes de dosis. La cohorte de mayor dosis sin embargo también mostró la mayor puntuación CDAI en la línea basal. Este estudio se aprobó por las comisiones de Ética Médica del Hospital Universitario de Leuven, Bélgica, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Países Bajos, Medizinische Klinik, Kiel, Alemania, y Centro Médico Hadassah, Jerusalén, Israel. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado al estudio.

#### *Diseño del estudio y protocolo de tratamiento*

ch5D12 es un anticuerpo IgG<sub>4</sub> humano modificado molecularmente por ingeniería genética que contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de la versión parental mAb 5D12. Se ha mostrado que este mAb se une a células que portan CD40 y antagoniza la activación mediada por CD40 de diversas células<sup>20-27</sup>. Se administró ch5D12 en un estudio multicentro, de dosis única, abierto, estudiando cuatro niveles de dosis. Hubo cinco sujetos en cada grupo de tratamiento excepto para la cohorte de dosis final en la que se admitieron solamente tres sujetos. Se realizó por vía intravenosa una administración única a niveles de dosis de 0,3, 1,0, 3,0 y 10,0 mg/kg de ch5D12. Después de completar el reclutamiento en un grupo de dosis, el reclutamiento en el siguiente grupo comenzó solamente cuando se había establecido la seguridad en el nivel de dosis actual. Se evaluó la actividad de enfermedad clínica en cada visita semanalmente durante el primer período de 28 días y una última visita posterior el día 56. Dos sujetos (cohorte de dosis de 3,0 mg/kg) se retiraron del estudio después de las evaluaciones del día 28 pero sus datos se incluyen en la evaluación. Los sujetos debían permanecer estables en la misma dosis de su medicación actual durante el transcurso del estudio. No se usó medicación conjunta no permitida durante el estudio. La respuesta a tratamiento con ch5D12 se definió como una reducción de CDAI de  $\geq 100$  puntos y la remisión de enfermedad clínica se definió como un CDAI de  $\leq 150$  (puntuación total) y una reducción de CDAI de al menos 100. Todos los sujetos que se sometieron a una endoscopia en la exploración y el día 28 ( $n = 11$ ) se analizaron con respecto a una reducción de su índice de puntuación de índice endoscópico de gravedad de enfermedad de Crohn (CDEIS). Se tomaron biopsias de estos 11 pacientes antes de y el día 28 después de la administración de ch5D12 para histopatología e inmunohistoquímica. Las evaluaciones de seguridad incluyeron exámenes físicos, señales vitales, ECG, y datos de laboratorio (químicos, hematológicos y análisis de orina), incluyendo, evaluaciones con anti-ADNbc, pANCA, y anticuerpo humano anti-quimérico (HACA). Los HACA se determinaron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) como se explica en la referencia (27).

#### 50 *Farmacocinética*

Se determinaron las concentraciones en suero de ch5D12 por ELISA como se ha descrito previamente<sup>27</sup>. Para determinar el revestimiento de CD40 por el ch5D12 inyectado, se recogió sangre en tubos de heparina y se diluyó dos veces en PBS. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en gradiente (Lymphoprep, Nycomed, Roskilde, Dinamarca) y se tiñeron 500.000 células con ch5D12 marcado con FITC y anti-CD20 marcado con PerCP (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, Estados Unidos) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Como un control de fondo para unión de 5D12-FITC, se tiñó un tubo separado de PBMC solamente con anticuerpo anti-CD20 marcado con PerCP. Los anticuerpos no unidos se retiraron por lavado, y las células se analizaron usando un citómetro de flujo (FACSsort, Becton-Dickinson). Se realizó adquisición de acontecimientos por



selección y adquisición de células que expresaban CD20 para un total de 5.000 acontecimientos. Si el número de células que expresaban CD20 era menor para un conjunto de muestra, se tuvo cuidado de adquirir el mismo número de acontecimientos en la preparación tanto teñida como no teñida.

#### *Histología e inmunohistoquímica*

5 Las biopsias de la mucosa del íleon y el colon obtenidas durante ileocolonoscopia antes del tratamiento el día 0 y el día 28 con unas pinzas convencionales se fijaron en formalina al 6 % para análisis rutinario. Las muestras adicionales se congelaron de forma instantánea inmediatamente en compuesto de temperatura de corte óptima Tissue-Tek (Miles Laboratories Inc, Naperville, IL, Estados Unidos) en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Las muestras fijadas en formalina se procesaron con parafina de forma rutinaria. Se prepararon secciones de cinco micrómetros de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones se analizaron usando un microscopio Leitz Wetzlar (Wetzler, Alemania). Se analizó un total de cuatro secciones semi-seriadas para cada muestra. Las muestras congeladas se usaron para análisis inmunohistoquímico, que se realizó usando un panel de mAb para evaluar la presencia de diferentes subconjuntos de linfocitos y monocitos/macrófagos. El panel se completó con mAb dirigidos contra CD40 y CD40L. Se realizó tinción inmunohistoquímica en secciones de criostato, se secó durante una noche a temperatura ambiente y se fijó en acetona absoluta durante 10 minutos. Los portaobjetos rehidratados se incubaron durante 30 minutos con los siguientes mAb: CD3 (clon: UCHT1, dilución 1/10) (Dako, Glostrup, Dinamarca), CD4 (clon: MT310, dilución 1/10) (Dako), CD8 (clon: 144B, dilución 1/20) (Dako), CD19 (clon: HD37, dilución 1/30) (Dako), CD40 (clon: 5D12, dilución 1/100) (PanGenetics, Ámsterdam, Países Bajos), CD68 (clon: Kp1, dilución 1/50) (Dako), CD154 (clon: M90, dilución 1/10) (Serotec, Oxford, Reino Unido). El mAb secundario fue una inmunoglobulina anti-ratón marcada con biotina (dilución 1/400; Dako) aplicada durante 30 minutos. Para bloquear eficazmente la peroxidasa endógena, también se incubaron secciones en solución de metanol que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % (v/v) durante 20 minutos. Después de tres lavados con PBS, se añadió el complejo marcado con avidina/peroxidasa de biotina (Dako). Entre las incubaciones, las secciones se lavaron en solución salina tamponada con fosfato a pH 7 durante 15 minutos. El producto de reacción se visualizó incubando la sección durante 10 minutos en tampón de acetato 0,05 M a pH 4,9, que contenía 3-amino-9-etil-carbazol 0,05 % (Janssen, Beerse, Bélgica) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 %, dando como resultado un sitio inmunorreactivo rojo brillante. A continuación, los portaobjetos se contra-tiñeron débilmente con hematoxilina de Harris, se aclararon con agua destilada y se aplicó un cubreobjetos con glicerol. Los controles, que fueron negativos, consistieron en una omisión de un anticuerpo primario o secundario, uso de cromógeno solo, y uso de IgG de ratón de isotipo coincidente irrelevante (vimentina; Dako).

Todas las secciones de parafina teñidas con hematoxilina y eosina, las analizó el mismo patólogo (K.G.) ciego para el origen de las muestras. Se evaluó la actividad de la enfermedad usando una puntuación numérica histológica<sup>40</sup> de la que la actividad máxima correspondía a 16. Las secciones teñidas de forma inmunohistoquímica también se analizaron de una manera ciega. Para 15 conjuntos de biopsias, las células con tinción positiva se contaron en campos de alta potencia (aumento x 40). Los campos se eligieron de acuerdo con la mayor densidad de células del estroma. El número se expresó como un porcentaje del número total de células mononucleares en el estroma. Estos recuentos se usaron para la construcción de un sistema de puntuación por el que la intensidad de las células teñidas positivamente se subdividió en cuatro categorías: -, +/-, + y ++. El valor normal para CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ y CD68+, para tanto el íleon como el colon es +. El valor normal para células CD40+ y CD154+ es negativo (-).

#### *Parámetros de seguridad inmunológica*

Para evaluar cualquier inmunosupresión no específica por ch5D12, se evaluó la proliferación de linfocitos T de sangre periférica en respuesta al mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Se realizó estimulación con PHA (1 µg/ml) en PBMC aisladas como se ha indicado previamente<sup>41</sup>. Además, se midieron los porcentajes de células CD3+, CD4+, CD8+ y CD20+ en circulación para excluir el agotamiento de células en circulación. Para citometría de flujo, se recogió sangre en los momentos indicados en tubos de heparina, de los que se tiñeron 100 µl de sangre completa en cada tubo de ensayo como sigue (todos los mAb se obtuvieron de Becton-Dickinson): anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD45-PerCP, anti-CD45-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE y anti-CD14-PE. Las células teñidas se analizaron después en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson). Este protocolo se realizó para calcular la relación de células CD4+ y CD8+ y para determinar la proporción de linfocitos B dentro de la población linfocítica. Los porcentajes presentados para CD3 y CD19 fueron porcentajes de linfocitos T y linfocitos B dentro de la población linfocítica, mientras que las células CD4 y CD8 se presentaron como porcentajes de células CD3. Sólo CD14 (población monocítica) se muestra como un porcentaje de la población CD45 total.

#### Resultados

##### *Farmacocinética*

55 Los niveles máximos medios de ch5D12 después de una única inyección i.v. eran dependientes de dosis y proporcionales a la dosis (Figura 1). Después de 24 horas, aproximadamente el 50 % del ch5D12 administrado podía detectarse en suero en las cohortes de las tres dosis mayores. Para la cohorte de 0,3 mg/kg, solamente estaba presente el 15 % en suero después de 24 horas. A partir de estudios de primates no humanos, se ha calculado una t<sub>1/2β</sub> de 8-10 días<sup>27</sup> que se confirmó por los datos humanos actuales. No se consiguió revestimiento

completo de CD40 en linfocitos B de sangre periférica por la infusión de 0,3 mg/kg como se determinó por un ensayo de competición *ex vivo* usando ch5D12 marcado con FITC (no mostrado). Para el grupo de 1,0 mg/kg, pudo observarse aproximadamente 1 semana de revestimiento de CD40 en linfocitos B en circulación, mientras que en los dos grupos de mayor dosis este período aumentó a 2-3 semanas. Esto indica que en el grupo de menor dosis, el antagonismo de CD40 era incompleto, mientras que se consiguió antagonismo completo en la cohorte de 1,0 mg/kg durante 1 semana y aún más en los grupos de mayor dosis.

#### *Respuestas clínicas*

El análisis de la evolución de CDAI indica que 13 de 18 sujetos (72 %) experimentaron una respuesta favorable después de la infusión de ch5D12. De forma similar, cuatro de 18 sujetos (22 %) experimentaron una remisión durante ese período. Cuando se evaluó el día 21, se registró una respuesta favorable en 10 de 18 sujetos. Las cohortes 2 y 4 mostraron la mayor reducción media de CDAI, y no se observaron claras relaciones entre dosis y efectos (Figura 2; Tabla 2). Una anova de medición repetida *post hoc* mostró una reducción estadísticamente significativa en CDAI durante el periodo de observación de 56 días ( $P < 0,001$ ). La diferencia entre las cohortes no fue estadísticamente significativa. Solamente en las cohortes 3 y 4 pudo evaluarse CDEIS (ya que se realizaron endoscopias solamente en tres sujetos en las cohortes 1 y 2). En la cohorte 3, dos de cinco sujetos tuvieron una reducción de CDEIS, mientras que en la cohorte 4, dos de tres sujetos tuvieron una reducción. Los sujetos restantes en estas dos cohortes no mostraron ningún cambio (no mostrado).

#### *Cambios histológicos*

En los pacientes de los que se tomaron biopsias ( $n = 11$ ), un único investigador realizó evaluación de los cambios en la histopatología e inmunohistoquímica. Las evaluaciones realizadas en el material de biopsia muestran una clara influencia del tratamiento sobre la actividad microscópica de la enfermedad así como sobre la intensidad del infiltrado de células mononucleares de lámina propia.

El cambio desde la línea basal a la puntuación de actividad de histopatología el día 28 se muestra en la Figura 3. Estaban disponibles muestras del íleon de nueve pacientes y muestras del colon de 11 pacientes el día 0. En cuatro casos, el íleon no estuvo implicado en la exploración mientras que cinco pacientes tuvieron enfermedad ileal activa. La puntuación histológica media el día 0 para los que tenían enfermedad activa era de 4,6 (intervalo 3-7). La puntuación histológica media para los cinco pacientes se redujo a 1,0 (intervalo 0-3) el día 28. En cuatro de 11 pacientes, el colon no estuvo implicado el día 0 y las muestras colónicas de estos pacientes permanecieron normales el día 28. En siete pacientes el colon estuvo claramente implicado con una puntuación histológica media el día 0 de 4,5 (intervalo 2-12). Esta se redujo el día 28 a una puntuación media de 1,7 (intervalo 0-7). En cinco de siete pacientes, la puntuación el día 28 fue 0, lo que indica una biopsia normal o 1 lo que indica solamente anomalías arquitectónicas. En la cohorte de menor dosis (panel a), la puntuación colónica de un sujeto se redujo, pero las otras puntuaciones colónicas en este grupo permanecieron altas y la puntuación del íleon incluso aumentó. En las cohortes de mayor dosis (paneles b-d), bien el íleon o bien el colon o ambos redujeron su puntuación de actividad el día 28 después del tratamiento con ch5D12. De forma concluyente, se observó una respuesta positiva [como se define en Ref. (41)] en el 81 % (9/11) de los sujetos. Además, siete sujetos con enfermedad activa el día 0 mostraron actividad neutrófila reducida hasta el punto de que no estaban presentes neutrófilos en sus biopsias el día 28.

Para evaluar a qué células se dirigía el tratamiento con ch5D12, se realizó una evaluación inmunohistoquímica por protocolo en las biopsias disponibles usando marcadores de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) y linfocitos B (CD19) y un marcador de macrófagos (CD68). Los resultados se enumeran en la Tabla 3. No se observó reducción el día 28 en la cohorte de menor dosis mientras que en todas las otras cohortes se observó reducción de la infiltración. En las muestras del íleon en la línea basal, hubo un aumento del número de linfocitos T CD3+ en seis de nueve casos. En el colon, estaba presente un número de linfocitos T CD3+ aumentado en cuatro de 11 pacientes, todos los cuales tenían también enfermedad activa en histología rutinaria. El día 28, los números de linfocitos T CD3+ se habían normalizado en todos excepto uno de los pacientes. En este paciente (paciente 001; grupo de menor dosis; 0,3 mg/kg), hubo un aumento de células CD3+ persistente en el íleon y el colon, en paralelo con la actividad inflamatoria persistente e inflamación granulomatosa en histología rutinaria. Las células CD4+ y CD8+ siguieron un patrón similar a CD3+.

El patrón para los linfocitos B CD19+ fue comparable al observado para los linfocitos T. El día 0, hubo una elevación de linfocitos B en seis de nueve pacientes de los que estaban disponibles biopsias del íleon y en cuatro de 11 pacientes del colon. El día 28, la cantidad de los linfocitos B se había normalizado en todos los casos excepto para el paciente con el grupo de dosis baja.

Se observó una reducción similar el día 28 para células monocíticas/macrófagos CD68+. El día 0, hubo un mayor aumento de células monocíticas/macrófagos CD68+ en cinco de nueve pacientes de los que estaban disponibles biopsias del íleon y en cuatro de 11 pacientes del colon. De nuevo todos los aumentos se habían normalizado el día 28, excepto para un paciente de cohorte de dosis baja que permaneció alto con respecto a células monocíticas/macrófagos CD68+ en la muestra del colon e incluso un aumento en la biopsia del íleon, lo que muestra que este paciente aún tenía enfermedad activa el día 28.

La Figura 4 muestra ejemplos representativos de la reducción de los tres tipos celulares principales (linfocitos T, linfocitos B y células monocíticas/macrófagos) en biopsias del íleon del paciente 011 (puntuación de actividad: 7) y biopsias colónicas del paciente 012 (puntuación de actividad: 12) antes de la administración de ch5D12 y el día 28 después de la administración de ch5D12.

## 5 Seguridad

No se retiró ningún sujeto del estudio debido a acontecimientos adversos (AA) siendo la mayoría de estos AA de gravedad leve a moderada. Una evaluación de los AA que se producen a  $\geq 5\%$  del número total de AA reveló que los AA más comunes eran pirexia, artralgia, mialgia y cefalea. La artralgia, que se produce frecuentemente tanto en la línea basal como durante el período de seguimiento, redujo su frecuencia a lo largo del transcurso del período de seguimiento. Se produjeron síntomas de tipo gripal y sarpullidos pruríticos en cuatro sujetos, de los que solamente un sujeto experimentó un sarpullido moderado que comenzó poco después de la administración del fármaco del estudio (3,0 mg/kg). En general, no hay una clara respuesta a dosis para ningún AA único, con la posible excepción de cefalea/migraña.

Hubo seis acontecimientos adversos graves (AAG) observados en seis sujetos; no se produjeron acontecimientos en la cohorte de 0,3 mg/kg, tres acontecimientos en la cohorte de 1,0 mg/kg, dos acontecimientos en la cohorte de 3,0 mg/kg y un acontecimiento en la cohorte de 10,0 mg/kg. Cinco de los seis AAG se consideraron posiblemente relacionados con el fármaco del estudio, un acontecimiento se consideró no relacionado. Todos excepto un acontecimiento fueron acontecimientos gastrointestinales (dos sub-ileales ambos en 1,0 mg/kg, dos enfermedades de Crohn agravadas, sujetos de 1,0 y 3,0 mg/kg; y un dolor abdominal agravado en un sujeto de 3,0 mg/kg). Dos de estos acontecimientos, sin embargo, se produjeron en un punto temporal tal que es muy poco probable que exista una relación causal con el fármaco del estudio (un sujeto el día de la infusión y otro sujeto después de someterse a endoscopia 29 días después de la administración del fármaco del estudio). Ninguna de las anomalías observadas parece relacionada con el fármaco del estudio o la dosis.

### *Parámetros de seguridad inmunológica*

Como ch5D12 inhibe la activación de linfocitos B *in vitro*, se determinaron los niveles de inmunoglobulina totales y se descubrió que eran estables durante el transcurso del período de seguimiento. Para excluir la posibilidad de que ch5D12 sea capaz de agotar los linfocitos B de la circulación los inventores realizaron análisis de subconjuntos de PBMC durante el transcurso del estudio. Los porcentajes y números absolutos de células positivas para CD3, CD4, CD8 y CD14 no se vieron afectados por la administración de ch5D12. Los recuentos absolutos de linfocitos B CD19+ en circulación se redujeron transitoriamente poco después de la administración de ch5D12 y recuperaron sus valores originales después de que ch5D12 se hubiera eliminado de la circulación (no mostrado).

Para estudiar si el tratamiento con ch5D12 provocaría un efecto supresor inmune general, se estimularon PBMC aisladas en diversos puntos temporales antes y después del tratamiento por el activador de linfocitos T policlonal PHA. Desafortunadamente, las células de la cohorte de dosis de 10,0 mg/kg no se congelaron apropiadamente y fueron por lo tanto incapaces de responder a PHA, incluyendo las células obtenidas antes de la administración de ch5D12. El índice de estimulación inducido por incubación con PHA fue altamente variable pero no se detectó ninguna tendencia hacia una reducción después del tratamiento con ch5D12 (datos no mostrados).

Los anticuerpos anti-ch5D12 no fueron detectables en las dos cohortes de dosis más bajas a lo largo de todo el estudio. En la cohorte de 3,0 mg/kg, se descubrió que un sujeto había montado una respuesta anti-ch5D12, aunque la señal era muy baja y solamente podía detectarse en la muestra del día 28 no diluida de este paciente. En el grupo de mayor dosis, otro sujeto tuvo anticuerpos anti-ch5D12 el día 28 y día 56 del estudio. Estos pudieron detectarse con una dilución 1:64. Por lo tanto, solamente dos sujetos tuvieron una posible respuesta inmune a administración de ch5D12.

### *Análisis*

En este ensayo multicentro, abierto, se administraron cuatro niveles de dosis de ch5D12 a sujetos con enfermedad de Crohn de moderada a grave. Se admitieron dieciocho sujetos, con cinco sujetos en cada grupo de tratamiento excepto para la cohorte de dosis final en la que solamente se admitieron tres sujetos. Los niveles en suero de ch5D12 aumentaron de forma dependiente de la dosis y la semivida en suero larga que se observó en monos *cinomolgus*<sup>27</sup> se confirmó en seres humanos. Este estudio muestra la viabilidad de antagonizar la activación de células mediada por CD40 usando ch5D12, en ausencia de efectos secundarios importantes. El análisis de CDAI indica que el 72 % de los sujetos experimentaron una respuesta clínica y el 22 % experimentaron una remisión durante el estudio. Estos resultados son prometedores; sin embargo el diseño abierto y la ausencia de un grupo de control hacen imposible atribuir definitivamente los cambios observados a la administración del fármaco del estudio. Sin embargo, los inventores tienen varios argumentos en favor del efecto antiinflamatorio de ch5D12. En primer lugar, la reducción observada en CDEIS entre sujetos en las dos cohortes de mayor dosis apoya la eficacia del tratamiento. En segundo lugar, los resultados de los análisis histológicos e inmunohistoquímicos realizados en biopsias muestran que ch5D12 reduce la actividad inflamatoria en colon o íleon. En la cohorte de dosis baja no se observó un efecto claro. Los sujetos en la cohorte de 10,0 mg/kg tuvieron las puntuaciones de actividad histológica

más bajas el día 0 y la reducción en la puntuación de actividad está por tanto limitada en esta cohorte. Las puntuaciones más altas en la línea basal se encontraron en los grupos de 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg y en estos pacientes hubo una clara reducción de las puntuaciones histológicas el día 28.

5 Aunque se identificaron dos pacientes que tenían anticuerpos anti-ch5D12 en el presente estudio, los niveles de los anticuerpos HACA permanecieron muy bajos y sólo fueron detectables a diluciones en suero muy bajas. Aún debe establecerse si se detectaron respuestas anti-ch5D12 en estudios posteriores.

Este ensayo representa la primera administración de mAb anti-CP40 en general y de ch5D12 en particular a seres humanos. Sin embargo, se han obtenido previamente pruebas de la actividad biológica de mAb 5D12 *in vivo* en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en monos tití. La administración de 5D12 comenzando 2-4 semanas después de la inducción de la enfermedad tuvo claros efectos beneficiosos<sup>23</sup>. Esta prueba de concepto *in vivo* inició la humanización recombinante y posterior desarrollo de 5D12. La actividad biológica de ch5D12 también se evaluó en el modelo de EAE de tití. El día 50 después de la inmunización con MOG, la incidencia de la enfermedad en el grupo de placebo fue del 100 % (el 50 % de los animales se sacrificaron debido a la gravedad de su EAE), mientras que no se observaron señales de enfermedad en el grupo tratado con ch5D12<sup>24</sup>. Además ch5D12 ha mostrado actividad funcional en un modelo de trasplante renal de mono rhesus<sup>25</sup> y cuando se usó como una estrategia supresora inmune para evitar respuestas inmunes contra partículas adenovirales y sus productos<sup>26</sup>. Un estudio de reactividad cruzada de tejido en tejidos humanos y de cinomolgus mostraron que ch5D12 se unía a la superficie celular de linfocitos B y DC en órganos linfoides. No se observó reactividad cruzada inesperada en tejidos humanos o de cinomolgus. Se realizó una evaluación de seguridad y tolerancia para ch5D12 en monos cinomolgus, en los que se mostró que la administración semanal de ch5D12 durante 4 semanas era segura y sin ningún efecto secundario en todos los monos. En este estudio, se obtuvieron pruebas funcionales de que ch5D12 puede prevenir la activación y proliferación de linfocitos B<sup>27</sup>. Colectivamente estos estudios mostraron que el mAb antagonista anti-CD40 humano ch5D12 no tiene reactividad cruzada inesperada, es seguro, limita la reactividad inmune en monos cinomolgus, e inhibe una enfermedad inflamatoria crónica prototípica del sistema nervioso central en monos tití. Por lo tanto, la evaluación preclínica apoyó el desarrollo adicional para su uso en pacientes.

La ruta co-estimuladora de CD40-CD154 (CD40L) se ha validado en modelos animales como una diana clínica prometedora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes<sup>15</sup>. Potencialmente la interacción CD40-CD154 puede inhibirse marcando como objetivo CD40 o CD154. Todos los estudios anteriores se han centrado en antagonizar CD154, que se expresa selectivamente en linfocitos T activados y plaquetas<sup>8-11</sup>. Se han detenido estudios clínicos humanos que usaban un mAb anti-CD154 humano debido a acontecimientos tromboembólicos<sup>12-14</sup>. Como este mAb anti-CD154 se construye como una IgG1 humanizada, que se une extremadamente bien a receptores Fc, el mAb anti-CD154 puede entrecruzar CD154 con receptores de Fc dando como resultado la formación de coágulos sanguíneos. Recientemente, se ha indicado que CD40 se expresa de forma constitutiva en plaquetas y se ha descubierto que es funcionalmente importante usando CD154 soluble como un estímulo para la activación de plaquetas. Estos efectos estimuladores que dan como resultado la activación de plaquetas se anularon por la adición de mAb anti-CD154 o anti-CD40<sup>42</sup>. Los inventores confirmaron las características no estimuladoras de ch5D12 también en experimentos con plaquetas humanas, ya que la adición de ch5D12 con plaquetas preestimuladas usando concentración sub-óptima de ADP o colágeno no tenía ningún efecto en el estado de activación de las plaquetas (M.F. Hoylaerts, observaciones no publicadas, Leuven, Bélgica). Además, la parte Fc de IgG<sub>4</sub> de la cadena principal del mAb ch5D12 tiene capacidad reducida para unirse a receptores de Fc expresados en plaquetas en comparación con una cadena principal de IgG<sub>1</sub>. Surge diferenciación adicional entre los dos enfoques del hecho de que ch5D12 se dirige a linfocitos B, monocitos, macrófagos y DC, mientras que un mAb anti-CD154 se dirige principalmente a linfocitos T activados, dando como resultado estrategias clínicas notablemente diferentes. No se observaron indicios de tromboembolia en ninguno de los pacientes tratados en este estudio.

El efecto de ch5D12 se basa principalmente en la interferencia con la activación celular mediada por CD40. El accionamiento de CD40 induce la secreción de citocinas y quimiocinas por macrófagos y DC, y potencia la capacidad presentadora de antígenos de estos últimos. Como ch5D12 antagoniza al receptor CD40 a través del que se induce la producción de TNF- $\alpha$ <sup>39</sup>, también podría antagonizar la secreción de TNF- $\alpha$  que indudablemente es una citocina importante en la enfermedad de Crohn<sup>43</sup>. Sin embargo, también se inducen varias otras citocinas inflamatorias, tales como IL-8 e IL-12<sup>39</sup>, por accionamiento de CD40 y por lo tanto ch5D12 podría tener propiedades anti-inflamatorias además de la prevención de producción de TNF- $\alpha$ . Si los efectos observados dependen principalmente de una activación de linfocitos T reducida, o una liberación reducida de citocinas y quimiocinas, aún debe investigarse más.

55 Este primer estudio en el hombre con ch5D12 muestra beneficios clínicos prometedores en ausencia de efectos secundarios graves. Se necesitarán estudios clínicos adicionales para establecer el papel y esquema de dosificación óptimo para ch5D12 en el mantenimiento de remisiones y en la supervisión de seguridad de múltiples infusiones. Obviamente, el beneficio terapéutico por antagonizar CD40 no se limitará a enfermedad de Crohn y puede extenderse potencialmente a muchos otros trastornos inflamatorios.

60

**Ejemplo 2**

**Material y Procedimientos**

*Generación de la versión quimérica de 5D12*

5 Comenzando a partir de la línea celular de hibridoma 5D12 se clonaron las regiones variables murinas 5D12. Brevemente, a partir de las células lisadas usando Qiagen se aisló ARN total. Por RT-PCR usando los oligos 5' CAG GTS MAR CTS SAG SAG TC W GG 3' y 5' GCA TGT ACT AGT AAT TTT TGT CCA TVT CYT TGG TGC T 3' para amplificar la región VH y usando los oligos 5' CGA TAC GAS MTY CAG CTG ACC CAG TCT CCA 3' y 5' GAC TCA TCT AGA TAC ACT CAT TCC TGT TGA AGC TCT TG 3' para amplificar la región VL de mu5D12. Después de análisis de secuencia se determinaron las secuencias consenso para las regiones V. Posteriormente las regiones V se volvieron a clonar en pcDNA3002 (Marissen y col. J. of Virol, 2005: 79:4672-4678), junto con secuencias genómicas que codificaban IgG<sub>4</sub> humana y kappa humana para construir un plásmido de expresión de inmunoglobulina IgG<sub>4</sub> quimérico.

*Generación de la versión desinmunizada de 5D12*

15 En colaboración con Biovation usando su tecnología Delmmunisation patentada dentro de las regiones V se identificaron epítomos de linfocitos T potenciales. Los epítomos de linfocitos T auxiliares comprenden secuencias de aminoácidos cortas dentro de proteínas con la capacidad para unirse a moléculas del MHC de clase II. Al retirar los epítomos de linfocitos T el anticuerpo ya no puede desencadenar colaboración de linfocitos T y la inmunogenicidad posterior contra él. Se realizó identificación usando reconocimiento de plegamientos peptídicos. El enfoque de reconocimiento de plegamientos peptídicos es un procedimiento basado en ordenador para predecir la unión de péptidos (secuencias de aminoácidos pequeñas) con 18 moléculas diferentes del MHC de clase II humano basándose en estructuras conocidas resueltas por cristalografía de rayos X. Además se realizó un análisis para buscar en las regiones V la presencia de péptidos de unión a linfocitos T humanos conocidos a partir de una base de datos ([www.wehil.wehi.edu.au](http://www.wehil.wehi.edu.au)).

25 Basándose en las secuencias de aminoácidos de la región V murina primaria, se diseñaron regiones V humanizadas en superficie (revestidas). Dentro de estas secuencias VH revestidas se identificaron 8 epítomos de linfocitos T potenciales y dentro de la región VL revestida 4 epítomos de linfocitos T. Se retiraron los epítomos de linfocitos T identificados por sustitución de aminoácidos. Basándose en este análisis las secuencias de ADN que codifican la región VH y VL desinmunizada se sintetizaron y se volvieron a clonar en el plásmido de expresión pcDNA3002-hlgG<sub>4</sub>-kappa.

30 *Mutagénesis dirigida*

Para restaurar las secuencias murinas dentro de la región VH del plásmido de expresión pcDNA3002 desinmunizado se usó el kit de mutagénesis dirigida QuickChange de Stratagene de acuerdo con el protocolo del fabricante. En la Tabla 4 se muestran los oligonucleótidos usados. Brevemente, el plásmido se desnaturalizó seguido de hibridación de los cebadores sentido y anti-sentido que contienen la mutación deseada. Realizando ciclos (30 segundos 95 °C; 30 segundos 55 °C; 600 segundos 68 °C) 16 veces usando una máquina de PCR de gradiente T Biometra se incorporaron las secuencias mutagénicas. El plásmido parental no mutado se digirió con DpnI, que solamente corta ADN metilado. Posteriormente la mezcla de PCR que contenía el plásmido mutado se transformó en células competentes XL1-Blue. Se seleccionaron colonias y se analizaron por secuencias de ADN con respecto al plásmido correcto. Un segundo conjunto de experimentos se centró en generar variantes adicionales de las posiciones 29 y 37 específicamente por sustitución con I de los V o L estructuralmente relacionados. De una manera similar a la descrita anteriormente, se generaron plásmidos usando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 6. Se requirieron dos ciclos de mutagénesis para crear dobles mutantes (Tabla 7). Se usaron plásmidos para transformar células competentes XL1-Blue.

*Expresión en PER.C6™*

45 Se realizó de forma transitoria expresión de las diversas versiones de 5D12 en PER.C6™ (Crucell). Brevemente, el día antes de la transfección, se tripsinizó y se contó PER.C6™. Las células se sembraron en placas con DMEM sustituido con FCS 10 % a una densidad de 4 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa de pocillos T24. Al día siguiente el medio se reemplazó con 0,5 ml de medio nuevo. Para cada pocillo se diluyó 1 µg de ADN plasmídico en 50 µl de OPTI-MEM I, que se combinó con un volumen igual de OPTI-MEM I que contenía 3 µl de reactivo LipoFectAMINE 2000 (LF2000) (Invitrogen). La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formaran los complejos de ADN-reactivo LF2000. Posteriormente los complejos de ADN-reactivo LF2000 (100 µl) se añadieron directamente a cada pocillo. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas, los sobrenadantes se analizaron con respecto a expresión de anticuerpos.

*ELISA*

55 La cantidad de anticuerpo expresado se midió por un ELISA de tipo sándwich. Brevemente, se revistieron placas EIA/RIA de 96 pocillos (Corning 3590) durante una noche a 4 °C con anticuerpo policlonal anti-IgG humano (Jackson

109-005-088), diluido 1/1000 en PBS (100 µl/pocillo). Después de bloquear con PBS que contenía Tween 0,05 % y BSA 1 %, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,05 %. Posteriormente, como patrón, se aplicó 5D12 quimérico purificado en valoración comenzando a 400 ng/ml hasta cero por triplicado. También se aplicaron muestras en valoración (sobrenadantes transitorios). Todas las diluciones se realizaron en PBS-Tween 0,05 %. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar 3 veces se aplicó anticuerpo de detección diluido 1/5000 (anti-kappa humana marcado con fosfatasa alcalina (Southern Biotech Associates 2060-04)) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de la retirada de incubación las placas se lavaron 5 veces. Se realizó tinción con sustrato de PNP (Sigma N-2765) (1 mg de PNP/ml de tampón de sustrato - Tris/HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 mM pH 9,5). Se midió la DO405 nm en un BioRad 550 Titertek usando como referencia 655 nm.

#### FACS

Por análisis de FACS se analizó la especificidad antigénica de los anticuerpos expresados. Las células JY son linfocitos B humanos transformados por VEB, que expresan CD40. Brevemente, se incubaron 100.000 células JY, con 100 µl de sobrenadante del experimento de expresión transitoria a 4 °C durante 20 minutos. Para retirar los anticuerpos no unidos las células se lavaron con PBS que contenía NaAzida 0,05 % y BSA 1 %. Como anticuerpo secundario se usó anti-IgG humana marcado con FITC diluido 1/100 (Jackson 109-095-127). Después de 20 minutos de incubación a 4 °C las células se lavaron. Finalmente se midieron las muestras celulares en un FACScan (BD).

#### Resultados

Después de análisis de varios clones se determinó la secuencia consenso para las regiones V murinas de 5D12 (Figura 5).

Las regiones V se rediseñaron por humanización de las superficies, conservando los aminoácidos murinos críticos. Mediante el procedimiento de reconocimiento de plegamientos peptídicos y la búsqueda en base de datos se determinaron epítomos de linfocitos T potenciales dentro de estas secuencias rediseñadas. Dentro de la región VH8 (primera base del epítomo potencial: posición 27, 30, 43, 46, 57, 61, 77 y 83) y dentro de la región VL 4 (posición 7, 13, 28 y 86) se identificaron epítomos potenciales. Basándose en el mapeo de epítomos de linfocitos T y el procedimiento de revestimiento se definieron las secuencias de aminoácidos de VH y VL desinmunizadas óptimas (Figura 6). Para retirar el epítomo de linfocitos T en la posición 61 en la región VH se prestó especial atención para no introducir un sitio de N-glicosilación potencial (N-X-T/S): se sustituyó NSA con STS. En este diseño final se cambiaron 12 posiciones en la región VH (contando la posición 60-62 como 1 cambio). Para la región VL se cambiaron 8 posiciones.

A partir de experimentos preliminares que comparan los niveles de expresión de 5D12 completamente desinmunizado (DI5D12) en comparación con ch5D12 (renombrado PG100) se descubrió que, debido a las mutaciones introducidas, DI5D12 se expresaba a niveles menores en comparación con la secuencia parental (datos no mostrados).

En principio cada sustitución puede influir en las características del anticuerpo expresado. Por lo tanto, para investigar la influencia de cada posición cambiada en la región VH en las características del anticuerpo se diseñaron 12 variantes adicionales (Figura 7). En cada variante 1 la posición se cambió de nuevo a la secuencia de aminoácidos murina original.

Para sellar los niveles de expresión y la funcionalidad de las diversas versiones se construyeron 14 plásmidos de expresión pDNA3002. Cada plásmido contenía la cadena principal de IgG<sub>4</sub> humana a la que se ligaban las regiones VH y la región kappa humana a la que se ligaban las regiones VL. Un plásmido codificaba ch5D12, en el que se usaron las regiones V murinas. Los otros 13 plásmidos son versiones desinmunizadas, en las que la región VL desinmunizada se usa en combinación con la región VH desinmunizada o una de las 12 variantes de VH mostradas en la Figura 7. Posteriormente se transfectaron células PER.C6™ con los 14 plásmidos usando LipoFectamine2000. También se incluyeron transfecciones simuladas negativas (sin plásmido). Después de 48 horas los sobrenadantes transitorios de cada transfección se recogieron y analizaron con respecto a expresión de anticuerpos. En la Figura 8 se muestran los datos de FACS. Claramente todas las construcciones ensayadas se unen a células JY, lo que indica que la especificidad de unión con CD40 de 5D12 está conservada.

Además los datos de FACS indican que los niveles de anticuerpo producidos son diferentes. Claramente hay una diferencia en el nivel de expresión entre DI5D12 y ch5D12 (PG100). Las variantes Q5E, K13A, E16Q, T17S, STS60NSA y T68S muestran las mismas características de expresión que DI5D12. Las otras variantes parecen aumentar los niveles de expresión. Para determinar con exactitud los diversos niveles de expresión, se analizaron todos los sobrenadantes por ELISA cuantitativo midiendo los niveles de anticuerpo. Como se muestra en la Tabla 5, las variantes ensayadas pueden dividirse en 3 grupos: baja o ninguna mejora en el nivel de expresión (Q5E, K13A, E16Q, T17S y STS60NSA), las variantes P45L, M48L, S79F y T108S restauran los niveles de expresión en comparación con ch5D12 (PG100) hasta el 40 %, mientras que las variantes I29L e I37V restauran el nivel por encima del 50 %. Especialmente la sustitución en la posición 29 (I a L) parece tener una gran influencia en los

niveles de expresión. La variante I29L se renombró posteriormente anticuerpo PG102.

5 La observación de que la sustitución en la posición 29 (I a L) y 37 (I a V) tienen ambas una gran influencia en los niveles de expresión era entre otras inesperada debido a que los aminoácidos I, L y V están cercanamente relacionados estructuralmente y los 3 juntos forman el grupo de aminoácidos de cadena ramificada. En un estudio posterior se estableció adicionalmente cuál era el efecto de sustituciones combinadas de los aminoácidos I en las posiciones 29 y 37 con aminoácidos estructuralmente relacionados V o L.

La Figura 9 muestra las variantes V-L-I que se diseñaron en alineamiento con ch5D12 (PG100), DI5D12 y PG102 (variante I29L).

10 Para ensayar los niveles de expresión y la funcionalidad de estas variantes V-L-I, se construyeron plásmidos de expresión pcDNA3002 adicionales que contenían la cadena principal de IgG<sub>4</sub> humana con la que se ligaba la región VH de una de las variantes y la región kappa humana con la que se ligaban las regiones VL, como se ha descrito anteriormente. Posteriormente las células PER.C6™ se transfectaron con los plásmidos usando LipoFectamine2000. Después de 48 horas los sobrenadantes transitorios de cada transfección se recogieron y analizaron con respecto a expresión de anticuerpos. Para determinar con exactitud los diversos niveles de expresión todos los sobrenadantes se analizaron por ELISA cuantitativa midiendo los niveles de anticuerpo. Como se muestra en la Tabla 8, las diversas combinaciones de una V, L o I en las posiciones 29 y 37 se asocian con niveles de producción variables. Esto demuestra adicionalmente que no solamente todas las sustituciones de V, L e I conducen en última instancia a niveles de producción mayores.

### Análisis

20 Reduciendo la inmunogenicidad de un anticuerpo terapéutico las características pueden cambiar. En este estudio se muestra que el diseño de desinmunización da como resultado un anticuerpo que aún tiene capacidad de unión con su antígeno, sin embargo, el anticuerpo solamente podría producirse a niveles bajos. Más probablemente tras la expresión hay un problema en el ensamblaje de la región VH y VL desinmunizada. Cambiando cada posición sustituida de nuevo a la secuencia murina original dentro de la región VH, se reveló que algunas posiciones eran esenciales para una expresión apropiada del anticuerpo. Especialmente los sitios que se basaron en el enfoque de reconocimiento de plegamientos peptídicos tuvieron una gran influencia en el nivel de expresión. Los cambios N terminales, todos introducidos basándose en el revestimiento, tuvieron poca influencia. Notablemente la sustitución de I por L en la posición 29 tuvo la mayor influencia, lo que era inesperado ya que ambos aminoácidos están cercanamente relacionados estructuralmente. La variante I29L se renombró posteriormente anticuerpo PG102.

30 Estudios posteriores demostraron que diversas combinaciones de V, L o I en las posiciones 29 y 37 conducían a variaciones en los niveles de producción, lo que demuestra que aunque los 3 aminoácidos de cadena ramificada V, L e I están estructuralmente cercanamente relacionados, la sustitución de cada uno de estos en las posiciones 29 y 37 tiene un impacto en los niveles de producción de los anticuerpos completos.

### **Ejemplo 3**

#### **35 Materiales y Procedimientos**

*Construcción, selección y desarrollo de una línea celular GS-CHO para la producción de PG102 (variante I29L).*

PanGenetics BV pidió a Lonza Biologics (Lonza) que realizara la construcción, selección y evaluación de una línea celular GS-CHO que expresara el anticuerpo kappa/IgG<sub>4</sub> recombinante humano PG102 (variante I29L).

40 Las líneas celulares se construyeron transfectando células huésped CHOK1SV con vectores generados usando el sistema de expresión génica de glutamina sintetasa (GS) de Lonza (documento WO2003054172). Las secuencias génicas se proporcionaron por PanGenetics. La línea celular CHOK1SV es una variante de suspensión de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) CHOK1, que se ha adaptado a medio definido químicamente, sin componentes animales (CDACF) (Bebbington y col (1192) Biotechnology 10:169-75, de la Cruz Edmonds MC y col (2006) Mol. Biotechnol.34:179-90).

45 Todos los reactivos, componentes de medios y materiales se obtuvieron de proveedores acreditados. La formulación de los alimentos SF40 y SF41, medio CM42, y el complemento de medio SPE se obtuvieron de Lonza. También se usó el medio CD CHO (Invitrogen) con la adición del agente selectivo L-metionina sulfoximina (MSX) para subcultivo rutinario de líneas celulares adaptadas a CDACF y con rojo fenol para transfección. El agente selectivo MSX se proporcionó por Sigma. Estos medios y alimentos no contienen antibióticos. La construcción del vector de expresión GS que codifica los genes para el PG102 también se realizó en Lonza. Las células huésped CHOK1SV se obtuvieron de un vial del banco de células de trabajo crioconservadas de Lonza 269-W.

#### *Cultivo celular, concentración y viabilidad*

Las células se revivieron de viales de reservas crioconservadas calentando rápidamente a 37 °C y diluyendo en aproximadamente 50 ml de medio de cultivo. Los crioconservantes se retiraron centrifugando las células,

descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en medio de cultivo nuevo.

Para cultivo estático, las células se cultivaron en matraces T25 con un volumen de cultivo de 5 a 15 ml. Estos cultivos estáticos se situaron en un incubador de 35,5 a 37,0 °C que contenía una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10 % v/v en aire.

- 5 Para cultivo de suspensión, los cultivos se expandieron en un volumen adecuado de medio de cultivo y se subcultivaron cada 4 días para cultivo en medio CDACF. Los recipientes usados fueron: matraces de agitación de 125 ml (para un volumen de cultivo de 10 a 30 ml), matraces de agitación de 250 ml (para un volumen de cultivo de 30 a 50 ml), matraces de agitación de 500 ml (para un volumen de cultivo de 50 a 100 ml), frascos rotarios de 1 l (para un volumen de cultivo de 100 a 200 ml), o frascos rotarios de 2 l (para un volumen de cultivo de 200 a 400 ml).
- 10 Al espacio vacío de cada cultivo se le aplicó gas con CO<sub>2</sub> al 5 % v/v en aire y los matraces se sellaron. Los cultivos se incubaron después de 35,5 a 37,0 °C en una plataforma de agitación que rotaba a 140 ± 5 rpm.

Se obtuvieron concentraciones celulares totales y viables retirando de forma aséptica una muestra de cultivo, tiñendo las células no viables con azul de tripano y por examen microscópico usando un hemocitómetro Fuchs-Rosenthal modificado. Cuando fue apropiado, las muestras se diluyeron antes del recuento.

- 15 Como alternativa, las concentraciones celulares totales y viables se determinaron usando un contador de partículas CASY-1 o un contador celular automático Vi-CELL XR. Para el contador CASY-1, se retiró de forma aséptica una muestra de cultivo de cada matraz, se diluyó con tampón Casyton y se determinó el número de células viables y totales. Las células viables y no viables se distinguieron por tamaño. El porcentaje de viabilidad se calculó como la relación de células viables y células totales multiplicada por 100. Para el contador Vi-CELL XR, se retiraron de forma
- 20 aséptica 0,7 ml de cultivo celular y se realizó un recuento con azul de Tripano automático. Se usó una serie de fotografías y un algoritmo de análisis informático para identificar y contar las células viables y no viables. Para todos los procedimientos de recuento, se calculó el porcentaje de viabilidad como la relación de células viables y totales multiplicada por 100.

#### *Transfección de células huésped CHOK1SV*

- 25 El día de la transfección, las células que crecían en medio no selectivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron a una concentración de  $1,43 \times 10^7$  células viables/ml. Para cada transfección, se añadieron aproximadamente 0,7 ml de la suspensión celular y 40 µg de ADN plasmídico a una cubeta de electroporación. La cubeta de electroporación se situó después en el aparato de electroporación y se suministró un único pulso de 300 V, 900 µF. Después de la electroporación, las células de la cubeta se distribuyeron en placas de 96 pocillos a
- 30 aproximadamente 5000 células huésped/pocillo, usando el medio CD-CHO/rojo fenol. Las placas se incubaron de 35,5 a 37,0 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10 % v/v en aire. El día después de la transfección, se añadieron 150 µl del medio selectivo CD-CHO/rojo fenol/MSX 66,6 µM a cada pocillo. La concentración final de MSX en cada pocillo fue 50 µM. Las placas se supervisaron para determinar cuándo murieron las células no transfectadas para dejar
- 35 focos de células transfectadas. Los focos de células transfectadas resultaron evidentes aproximadamente de 3 a 4 semanas después de la transfección. Todos los transfectantes examinados y que progresaron adicionalmente vinieron de pocillos que contenían solamente una única colonia, como se determinó por evaluación visual.

#### *Evaluación de la productividad de las líneas celulares en cultivo estático*

- Las placas de 96 pocillos se incubaron durante aproximadamente 3 a 4 semanas, después de la transfección para permitir la formación de colonias. Las colonias se examinaron de forma microscópica para verificar que eran de un
- 40 tamaño adecuado (que abarcaba más del 60 % del fondo del pocillo), y que estaba presente solamente una colonia en cada pocillo. El sobrenadante de cultivo se ensayó después con respecto a producción de anticuerpos usando ensayo de ELISA de Lonza para anticuerpo ensamblado, descrito en "ELISA de ensamblaje". El porcentaje de confluencia del pocillo se evaluó en el momento de la toma de muestras. El valor obtenido dividiendo el resultado de ensayo por el porcentaje de confluencia se usó para clasificar las líneas celulares.

- 45 Los cultivos de líneas celulares de clasificación alta se expandieron a placas de 24 pocillos en el medio CD-CHO/rojo fenol/MSX 25 µM y se dejó que alcanzara la confluencia. Al alcanzar la confluencia, este cultivo se usó para inocular un matraz T25 en el medio CD-CHO/rojo fenol/MSX 25 µM, mientras que al cultivo restante se le volvió a introducir CD-CHO nuevo/rojo fenol/MSX 25 µM, y se incubó durante 14 días adicionales. En este punto, se
- 50 recogió sobrenadante de cultivo de las placas de 24 pocillos y se midió la concentración de anticuerpo usando el ensayo de ELISA de Lonza para el anticuerpo ensamblado. Se realizó una selección de las líneas celulares más productivas. Al alcanzar la confluencia en los matraces T25, se permitió que las líneas celulares seleccionadas crecieran en multicapa y después se volvieron a alimentar con CD-CHO/MSX 25 µM. Después de la alimentación, los cultivos se devolvieron al incubador durante cuatro a siete días adicionales hasta que el medio se volvió naranja/amarillo de nuevo y las células se tomaron de los matraces.

55



*Expansión de líneas celulares a cultivo en suspensión CDACF*

Los cultivos en suspensión se iniciaron a partir de cultivos de matraz T25 confluyentes. Los cultivos de suspensión se inocularon a una concentración de 0,05 a 0,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml en matraces de agitación de 125 ml que contenían medio CD-CHO/MSX 25 µM. Si la concentración de células viables no alcanzó 0,05 x 10<sup>6</sup> células viables/ml después de un máximo de 14 días en matraces T25, se avanzaron automáticamente 15 ml de cada cultivo a 15 ml de CD-CHO/MSX 25 µM en matraces de agitación de 125 ml. Después las líneas celulares se subcultivaron en serie en medio CD-CHO/MSX 25 µM nuevo, a una concentración de inoculación de 0,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, en un régimen de subcultivo de 4 días, hasta que se obtuvieron características de crecimiento aceptables y reproducibles.

10 *Evaluación del crecimiento y productividad de líneas celulares en cultivo de suspensión*

Cultivo en matraz de agitación semicontinuo

Se prepararon cultivos de pocillo único de cada línea celular seleccionada en matraces de agitación de 500 ml con 100 ml de suspensión celular usando medio CM42/4 x SPE. Los cultivos se inocularon a 0,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml y el espacio vacío de cada cultivo se equilibró con CO<sub>2</sub> al 5 % v/v en aire. Los cultivos se incubaron de 35,5 a 37,0 °C en una plataforma de agitación rotatoria a 140 ± 5 rpm hasta que la concentración celular viable, después del pico, era menor de o igual a 0,6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml o se alcanzó el día 15 ("crecimiento excesivo"). En este punto, se recogieron los cultivos. La concentración celular se determinó diariamente usando un contador celular automático Vi -CELL. A una concentración celular de 1,4 a 2,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, se realizó una adición de embolada del alimento nutriente SF40. Se realizaron adiciones de embolada adicionales a aproximadamente 24, 48 y 72 horas después de la adición inicial. Se aplicó un segundo alimento (SF41) una vez que se habían obtenido concentraciones celulares mayores de 4,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml. Se tomaron muestras de cultivo a intervalos apropiados, se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -20 ± 5 °C hasta que se ensayaran con respecto a concentración de anticuerpos por HPLC de proteína A. Los sobrenadantes recogidos de cada cultivo con crecimiento excesivo se almacenaron a -20 ± 5 °C. Los diez cultivos con crecimiento excesivo con las mayores concentraciones de anticuerpo se evaluaron adicionalmente con respecto a la calidad del anticuerpo producido. Las muestras se evaluaron con respecto a niveles agregados usando el procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento de permeación en gel (GP-HPLC) antes de la purificación de proteína A y caracterización de anticuerpos por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) reducida y no reducida y análisis de isoelectroenfoque (IEF) y análisis de oligosacáridos por espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF-EM).

*Crioconservación*

Las células se crioconservaron en puntos clave a lo largo del programa de trabajo. Las células en cultivos de crecimiento se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en una mezcla de crioconservación. Esta consistió en el medio de cultivo apropiado (92,5 % v/v) y dimetil sulfoxido (7,5 % v/v).

35 Después se distribuyeron alícuotas de células en viales marcados, conteniendo cada alícuota aproximadamente 1,5 ml del medio de crioconservación y aproximadamente de 0,5 a 1,5 x 10<sup>7</sup> células viables. Los viales se congelaron después en una máquina de congelación de células programable automática y posteriormente se transfirieron a frigoríficos de nitrógeno líquido.

*Número de generación*

40 Par cada una de las líneas celulares seleccionadas, el número de generación de las células se definió como cero en el punto en el que el cultivo se pasó a suspensión. El número de generación se calculó posteriormente en cada subcultivo usando un procedimiento derivado de la siguiente ecuación (redondeado hacia abajo a la siguiente generación de 0,5).

$$N_f = N_i + \left\{ \frac{1}{\ln 2} \cdot \ln \frac{X_f}{X_i} \right\}$$

- 45 En la que: N<sub>f</sub> = Número de generación en el momento f  
 N<sub>i</sub> = Número de generación en el momento i  
 X<sub>f</sub> = Concentración de células viables (células/ml) en el tiempo f  
 X<sub>i</sub> = Concentración de células viables (células/ml) en el tiempo i y f > i

*Análisis de datos*

50 Se calculó la integral del tiempo del área bajo la curva de crecimiento (la integral con respecto al tiempo tiempo de la concentración de células viables (IVC); 10<sup>9</sup> células x hora/l) sumando el área (aproximado a un trapecio de ángulo recto) entre valores de concentración de células adyacentes. Las áreas se calcularon multiplicando la media de las

dos concentraciones de células viables (células/ml) por el tiempo transcurrido entre las dos determinaciones (h). Este procedimiento se basa en el descrito por Renard y col. (1988) en *Biotechnology Letters* 10 (2) páginas 91-96.

5 Cuando fue apropiado se calculó la velocidad de producción específica global ( $q_P$  global: mg/10<sup>9</sup> células/hora) por análisis de regresión lineal de la concentración de anticuerpo (mg/l) frente a la integral con respecto al tiempo de la concentración de células viables. La pendiente de esta línea es igual a  $q_P$  global. La velocidad de producción específica de recogida ( $q_P$  de recogida) se calculó dividiendo la concentración de anticuerpo recogido por el valor de la IVC en el momento de recogida.

*ELISA de ensamblaje*

10 La concentración de anticuerpos de muestras de sobrenadante se determinó usando un ELISA que mide IgG humana ensamblada. Este implicó la captura de anticuerpos ensamblados en muestras y patrones en una placa de 96 pocillos revestida con Fc de cabra anti IgG humana. El anticuerpo unido se reveló con cadena ligera anti humana de cabra ligada a peroxidasa de rábano rústico y el sustrato cromogénico tetrametilbencidina. El desarrollo del color fue proporcional a la masa del anticuerpo presente en la muestra. La concentración se determinó usando una curva patrón generada usando un patrón de IgG (número de lote L07387/5/2).

15 *HPLC de Proteína A*

La concentración de producto se cuantificó por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) de Proteína A en una HPLC Agilent 1100. El anticuerpo se unió selectivamente a una columna de inmunodetección de Proteína A POROS. El material no unido se eluyó de la columna y el anticuerpo unido restante se liberó reduciendo el pH del disolvente. La elución se supervisó por absorbancia a 280 nm usando un detector de múltiples longitudes de onda. El anticuerpo se cuantificó (usando software Chemstation) contra un patrón de anticuerpo (Lote L07385/4/10) y se corrigió con respecto a un coeficiente de extinción de

$$E_{280\text{nm}}^{0.1\%} = 1.52$$

*Purificación de afinidad de Proteína A*

25 Se prepararon columnas de Sepharose de Proteína A rmp alimentados por gravedad (5 ml). Las columnas se limpiaron antes de su uso con guanidina HCl 6 M y se equilibraron con tampón de glicina/glicinato 50 mM-NaCl 50 mM, pH 8,0. El pH del material de carga de la columna se ajustó a pH 8,0 ± 0,1 antes de la aplicación a la columna. La columna de afinidad de proteína A rmp se lavó con tampón de equilibrio y se eluyó con tampón de glicina 0,1 M, pH 3,5. Los eluatos de la columna se neutralizaron a aproximadamente pH 7,0 con base Tris 2 M y se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco en preparación de análisis de IEF y SDS PAGE.

30 *Análisis de SDS PAGE de anticuerpo purificado por afinidad con proteína A*

Las muestras de cultivo celular se prepararon para análisis por purificación de proteína A. Se llevó a cabo electroforesis usando geles de poliacrilamida Novex previamente moldeados de 4 al 20 %. Para reducir SDS PAGE, las muestras se redujeron usando 2-mecaptoetanol y se desnaturalizaron por SDS a pH 8,0. Las muestras se calentaron durante 2,0 ± 0,5 minutos antes de que se cargaran en el gel (10 µg por carril). Se realizó SDS PAGE no reducida usando los mismos geles y tampón de muestra no reductor Novex (no se añade 2-mecaptoetanol). Las muestras se calentaron durante un tiempo convencional de 1,0 ± 0,5 minutos antes de que se cargaran en el gel (4 µg por carril). Después de la electroforesis, las proteínas se visualizaron tiñendo durante 75 minutos con azul brillante de Coomassie R250 y se destiñeron con metanol/ácido acético.

*Análisis de IEF del anticuerpo purificado por afinidad con Proteína A*

40 Las muestras de cultivo celular se prepararon para análisis por purificación con proteína A. Se llevó a cabo análisis de IEF usando geles IEF de agarosa previamente moldeados, pH 3 a pH 10. Se cargaron aproximadamente 10 µg de muestra proteica por carril en el gel y después se preenfocaron para 70 Vh. Después de la retirada de la tira de aplicación de muestra, la electroforesis se continuó para 1500 Vh (1500 V, 20 mA, 25 W por gel). Los geles de IEF se fijaron en una solución de ácido tricloroacético: ácido sulfosalicílico: metanol y después se tiñeron con azul brillante de Coomassie R250 (números de lote de azul de Coomassie 003/L11905/118 y 003/L11905/131). Los geles se destiñeron y se secaron. (Números de lote de destinción 003/L11905/117 y 003/L11905/121).

*GP-HPLC*

50 El procedimiento de GP-HPLC separa los componentes proteicos de acuerdo con su tamaño. Los componentes grandes, tales como agregados proteicos, son demasiado grandes para penetrar en las partículas de la matriz en gran medida y por lo tanto se eluyen de la columna antes que los componentes más pequeños, tales como monómeros proteicos. Los componentes más pequeños, tales como fragmentos, penetran en la matriz más fácilmente y se eluyen después del monómero. Esta técnica se usó por lo tanto para separar monómeros de anticuerpos de ambos agregados y fragmentos. El componente monomérico se identificó por su tiempo de retención y posición característicos, en relación con los marcadores de calibración.

Se inyectaron muestras no diluidas para proporcionar cargas de 50 a 250 µg cuando el producto de concentración fue de 1 a 5 mg/ml (intervalo de carga validado del ensayo de Lonza). El intervalo de masa molecular para la columna GF-250 fue de 4 a 400 kDa.

- 5 Se detectaron componentes de la muestra a 280 nm y se analizaron los cromatogramas de picos usando el software Agilent Chemstation. Se realizó integración usando el procedimiento de traza de perpendiculares para agregados y aproximación de la tangente para fragmentos.

La proporción de componentes de muestras se determinó por cálculo de las áreas máximas de cada componente en relación con el área máxima integrada total.

#### *Análisis de MALDI TOF-EM*

- 10 El análisis de oligosacáridos del anticuerpo PG102 producido por cada línea celular se realizó por MALDI TOF-EM usando un MALDI-LR Micromass<sup>TM</sup> acoplado con extracción retardada. El MALDI TOF-EM se manejó en configuración de reflectrón con modo de iones positivos. El instrumento se calibró usando un patrón de N-glicano mixto.

- 15 El anticuerpo se purificó de sobrenadantes recogidos usando una columna de proteína A POROS. Las fracciones purificadas se recogieron y los enlaces disulfuro se redujeron con ditioneitol seguido de alquilación de los tioles reducidos usando yodoacetato. Los oligosacáridos se liberaron usando la enzima N-glicanasa (PNGasaF) y se intercalaron entre dos capas de matriz de ácido súper-dihidroxi benzoico (súper-DHB) en la placa diana para análisis MALDI TOF-EM.

#### *Resultados*

- 20 *Transfección de células huésped CHOK1SV*

- La secuencia génica de PG102 se usó por Lonza para construir el vector de doble gen pPG102/DGV (no mostrado) que se usó para transfectar la línea celular huésped CHOK1SV por electroporación. Se realizaron seis conjuntos de transfecciones usando el vector pPG102/DGV y se exploraron los sobrenadantes de 255 transfectantes para producción de anticuerpos en placas de 96 pocillos por ELISA de ensamblaje. Se produjeron niveles de anticuerpo detectables por el 99,6 % de los transfectantes explorados. Se seleccionaron cuarenta y tres transfectantes de clasificación alta para evaluación adicional en placas de 24 pocillos.

#### *Expansión de cultivos estáticos y adaptación de la suspensión*

- 30 Se expandieron en primer lugar cultivos de las líneas celulares GS-CHO seleccionadas en placas de 24 pocillos y después se expandieron en matraces estáticos T25. Las células restantes en las placas de 24 pocillos se alimentaron con medio nuevo y “crecieron en exceso” antes de evaluar la productividad del anticuerpo. Las líneas celulares seleccionadas presentaron un intervalo de concentraciones de anticuerpo de 8,3 a 120 mg/l (Figura 10).

- 35 Los cultivos de las 23 líneas celulares con las mayores concentraciones de producto, como se determinó por ELISA de ensamblaje, se seleccionaron para evaluación adicional. Los cultivos seleccionados se avanzaron a medio CDACF en cultivos de suspensión. Todas las líneas celulares se adaptaron con éxito a cultivo de suspensión y se seleccionaron para evaluación adicional en cultivos semicontinuos.

#### *Evaluación de las características de crecimiento y productividad de las líneas celulares seleccionadas en cultivo en matraz de agitación semicontinuo*

- 40 Las características del crecimiento y productividad de las 23 líneas celulares seleccionadas se evaluaron en cultivo en matraz de agitación semicontinuo. Se prepararon cultivos de un único pocillo para cada línea celular. Se añadieron dos alimentos, SF40 y SF41, a los cultivos cuando la concentración de células viables cumplió los criterios de alimentación. El protocolo usado para el régimen de alimentación se asemeja tanto como sea técnicamente posible al procedimiento de fermentación de GS-CHO genérico de Lonza. Se presentan datos de crecimiento y productividad para las 23 líneas celulares seleccionadas en la Tabla 9. El análisis de HPLC de proteína A de los sobrenadantes recogidos de los cultivos en matraces de agitación semicontinuos mostró que cuatro líneas celulares producían concentraciones de anticuerpo mayores de 1.000 mg/l. La línea celular L107 produjo la mayor concentración de anticuerpo, 1674 mg/l.

#### *Caracterización del anticuerpo purificado del cultivo en matraz de agitación semicontinuo de líneas celulares CHO seleccionadas*

- 50 Se purificaron muestras recogidas de las 10 líneas celulares con la mayor concentración de anticuerpos usando cromatografía de Sepharose de proteína A rmp antes del análisis. Los anticuerpos purificados con proteína A se analizaron después usando SDS PAGE e IEF. El análisis visual de las muestras purificadas con proteína A analizadas por SDS PAGE en condiciones no reductoras mostró que todas las muestras eran comparables entre sí, mostrando una banda de anticuerpo intacto en aproximadamente 200 kDa (datos no mostrados). También eran visibles bandas menores adicionales, aunque podrían no ser todas visibles en la imagen del gel. También se

observaron tres bandas con masa molecular entre 116 y 200 kDa, una banda con un peso molecular entre 66 y 97 kDa, una banda con un peso molecular entre 36 y 55 kDa y dos bandas con pesos moleculares entre 22 y 31 kDa. La banda extra observada entre 66 y 97 kDa es el medio anticuerpo, típico de anticuerpos IgG<sub>4</sub> en condiciones no reductoras. El mismo medio anticuerpo también se observó en el control entre ensayos (IAC) de IgG<sub>4</sub>.

- 5 Las muestras purificadas con proteína A analizadas por SDS PAGE en condiciones reductoras también fueron comparables entre sí, mostrando la banda de cadena pesada a aproximadamente 50 kDa y la banda de cadena ligera a aproximadamente 25 kDa (datos no mostrados). El análisis de IEF mostró que la integridad de las muestras de anticuerpo purificado por proteína A de las líneas celulares seleccionadas demostró perfiles comparables, con seis bandas primarias (3 bandas principales y 3 menores) en el intervalo de pI de 8,15 a 9,30 para todas las líneas celulares excepto L97, M92 y M59. Estas tres líneas celulares mostraron tres bandas principales y dos menores. Se observaron bandas adicionales en las muestras J3 y J4, aunque estas pueden no ser todas visibles en la imagen del gel.

#### *Análisis de oligosacáridos del anticuerpo*

- 15 El análisis de oligosacáridos del anticuerpo producido por cada una de las diez líneas celulares seleccionadas para evaluación adicional en cultivos en matraz de agitación semicontinuos se determinó por MALDI TOF-EM. Las estructuras de oligosacáridos predominantes en el anticuerpo obtenido de las diez líneas celulares fueron G0F y G1F, que eran estructuras de oligosacáridos ligadas a N típicas observadas en los anticuerpos. Se detectaron niveles relativamente bajos de estructuras de oligomanosa con el mayor nivel de 6,7 % de glicanos totales medidos para anticuerpo derivado de la línea celular L52. Se observaron estructuras de oligomanosa-5 (man-5) en todas las muestras a un intervalo de 1,1 a 4,6 % de glicanos totales. Todas las muestras analizadas contenían niveles comparables de oligosacáridos y concentraciones relativamente bajas de man-5 (datos no mostrados).

#### *GP-HPLC*

- 25 Cuando se analizó el anticuerpo producido por cada una de las diez líneas celulares seleccionadas para evaluación adicional por GP-HPLC, los componentes de menor peso molecular (LMWC) fueron los menos críticos pero era preferible un nivel por debajo del 25 %. Todas las muestras presentaron niveles por debajo del 25 %, con la excepción de L52, que se presentaba a un nivel del 27,1 % (Tabla 10).

No se usarían habitualmente dos cálculos diferentes de proporciones de agregado, pero se consideró necesario ya que los niveles de LMWC variaban mucho entre las muestras.

- 30 Un análisis adicional de los datos, excluyendo los LMWC y mirando solamente a los monómeros y picos mayores, demostró áreas máximas agregadas de menos del 2,2 % para todas las muestras (Tabla 11). Los niveles por debajo del 5 % se consideran aceptables.

#### *Selección de líneas celulares*

- 35 Se seleccionaron tres líneas celulares para preparación de reservas antes de siembra (PSS). Los criterios de selección usados fueron una combinación de alta concentración de anticuerpo recogido, características de crecimiento aceptables y características de calidad de producto aceptables.

La línea celular L107 se seleccionó como la línea celular principal ya que mostraba la mayor concentración de anticuerpo recogido de las 23 líneas celulares evaluadas, junto con características de calidad de producto y crecimiento aceptables (Figura 11A).

- 40 La línea celular L25 mostró la segunda concentración de anticuerpo recogido mayor de las 23 líneas celulares evaluadas, junto con características de calidad de producto y crecimiento aceptables (Figura 11B). Por lo tanto se seleccionó la línea celular L25 como la primera línea celular de apoyo.

La línea celular M95 mostró la tercera mayor concentración de anticuerpo recogido de las 23 líneas celulares evaluadas, y tenía características de calidad de producto y crecimiento aceptables (Figura 11C). Basándose en esto la línea celular M95 se seleccionó como la segunda línea celular de apoyo.

- 45 *Crioconservación de reservas antes de la siembra*

Se crioconservaron reservas antes de la siembra (20 viales por reserva) para cada una de las tres líneas celulares seleccionadas. Estas reservas se almacenaron en frigoríficos de nitrógeno líquido en fase de vapor. Las líneas celulares L107, L25 y M95 se renombraron DC1, DC2 y DC3 respectivamente.

#### *Análisis*

- 50 Se pidió a Lonza Biologics que realizara la construcción, selección y evaluación de una línea celular GS-CHO que expresara el anticuerpo kappa/IgG<sub>4</sub> recombinante humano PG102.

La secuencia génica se proporcionó por PanGenetics y los vectores se generaron usando el Sistema de Expresión Génica de Glutamina Sintetasa (GS) de Lonza. La línea celular CHOK1SV, una variante de suspensión de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) CHO-K1 adaptada a medio sin componentes animales, definido químicamente, se transfectó por electroporación.

- 5 A partir de las transfecciones de CHOK1SV, se obtuvieron 254 líneas celulares que secretaban el anticuerpo. Se evaluaron 43 líneas celulares con respecto a crecimiento y productividad en placas de 24 pocillos. Se obtuvieron concentraciones de anticuerpo de hasta 120 µg/ml. Se evaluaron 23 líneas celulares en cultivos en matraz de agitación semicontinuos de un único pocillo. Se obtuvieron concentraciones de anticuerpo recogido en el intervalo de 121 a 1674 µg/ml. Se consiguieron concentraciones de anticuerpo recogido de más de 1.000 mg/l para cuatro líneas celulares. Las diez líneas celulares con mayores concentraciones de anticuerpos se seleccionaron para análisis de calidad del producto. La calidad del producto de anticuerpo purificado de cada una de las líneas celulares seleccionadas era comparables a las demás por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico reducido y no reducido y análisis de isoelectroenfoque. El análisis de oligosacáridos de anticuerpo purificado de cada una de las diez líneas celulares seleccionadas mostró niveles relativamente bajos (<4,6 %) de oligomanosa-5.
- 10
- 15 El análisis de GP-HPLC mostró que los niveles de agregados estaban por debajo del 1 % para cada una de las tres líneas celulares superiores.

Se seleccionaron tres líneas celulares (L107, L25 y M95) para evaluación adicional basándose en los datos de crecimiento, productividad y calidad del producto. Se crioconservaron reservas antes de la siembra de 20 viales de cada línea celular. Las tres líneas celulares se renombraron DC1, DC2 y DC3 respectivamente.

#### 20 **Ejemplo 4**

*Determinación de la cinética de unión de ch5D12 (PG100) y PG102 (variante I29L) con CD40-Fc humano por resonancia de plasmón superficial (Biacore)*

#### **Materiales y procedimientos**

- 25 Se comparó la cinética de unión de ch5D12 (PG100) y PG102 (variante I29L) con CD40 humano por resonancia de plasmón superficial a una temperatura constante de 25,0 °C, usando un instrumento Biacore 3000. Se usó el dominio extracelular CD40 humano recombinante fusionado con el dominio Fc de IgG1 humano (huCD40-Fc; R&D Systems número de catálogo 149-CD-50) como el antígeno diana en estos experimentos. Se acopló HuCD40-Fc (1 µg/ml en tampón acetato 10 mM, pH 5,0) mediante los grupos amina de restos de Lys con microplacas de CM5 Biacore activadas por carbodiimida, dando como resultado un nivel de inmovilización de antígenos de 127,4 UR.
- 30 Para análisis cinéticos, se prepararon series de dilución de ch5D12 (PG100) y PG102 (intervalo de 10,0 µg/ml a 0,313 µg/ml) en tampón de ejecución Biacore (solución salina tamponada con HEPES que contiene EDTA y tensioactivo; HBS-EP). Se realizaron análisis cinéticos a un caudal de 30 µl/minuto. Se permitió que las muestras se unieran durante 4 minutos y se disociaran durante 5 minutos, al mismo caudal. La superficie de la microplaca se regeneró después durante 30 segundos usando NaOH 30 mM y una línea basal reestablecida en HBS-EP durante 2,5 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra. Se inyectaron muestras alternas de PG102 y ch5D12 (PG100), aumentando la concentración para el primer conjunto de repeticiones en cada dilución y reduciendo después para el segundo conjunto de repeticiones.
- 35

- Se usó software de control BIAcore (Versión 3.2) para recogida de datos y se usó software BIAevaluation (Versión 4.1) para análisis de datos cinéticos. Los parámetros de unión se calcularon usando dos modelos diferentes de interacción molecular: un modelo analítico bivalente y un modelo de unión de Langmuir 1:1.
- 40

#### *Resultados*

Los niveles máximos de unión observada para los anticuerpos ch5D12 (PG100) y PG102 fueron 152,5 UR y 140,2 UR, respectivamente.

- 45 Las constantes de velocidad cinética calculadas de acuerdo con los modelos de unión de Langmuir y bivalente ( $k_a$  y  $k_d$ , o  $k_{a1}$  y  $k_{d1}$ , respectivamente) difirieron ligeramente para los dos anticuerpos. Por lo tanto, PG102 presentó velocidades de asociación y disociación más rápidas que ch5D12 (PG100) (Figura 12), aunque la afinidad global (KD) de los dos anticuerpos no difirió de forma apreciable dentro de los modelos. Se resumen a continuación los parámetros cinéticos de estos experimentos:

Modelo de Langmuir (1:1):

	<b>ch5D12 (PG100)</b>	<b>PG102</b>
$k_a$	$1,88 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_d$	$5,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$5,96 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
KD	$2,71 \times 10^{-10} \text{ M}$	$2,7 \times 10^{-10} \text{ M}$

Modelo de unión bivalente (1:2):

	<b>ch5D12 (PG100)</b>	<b>PG102</b>
ka1	$6,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$7,82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
kd1	$1,60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
ka2	$1,21 \times 10^{-3} \text{ URs}^{-1}$	$1,31 \times 10^{-3} \text{ URs}^{-1}$
kd2	$2,55 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
KD	$5,29 \times 10^{-9} \text{ M}$	$5,41 \times 10^{-9} \text{ M}$

El análisis de la Bondad de Ajuste para los dos procedimientos indicó que los datos se describen mejor por el modelo de unión bivalente.

- 5 Las afinidades calculadas de las dos variantes de anticuerpo difirieron entre los modelos, sin embargo, las estimaciones de las constantes de disociación (KD) obtenidas para cada anticuerpo con el mismo modelo eran comparables;  $2,71 \times 10^{-10} \text{ M}$  y  $2,37 \times 10^{-10} \text{ M}$  para ch5D12 (PG100) y PG102 respectivamente usando el modelo de Langmuir y  $5,25 \times 10^{-9} \text{ M}$  y  $5,41 \times 10^{-9} \text{ M}$  usando el modelo de analito bivalente.

### Ejemplo 5

*Inhibición de la unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con células JY usando un anticuerpo anti-idiotipo*

- 10 Para demostrar que PG102 (variante I29L) se une al mismo epítipo de CD40 que su molécula parental ch5D12 (PG100), se usó un anticuerpo anti-idiotípico para inhibir la unión de PG102 o ch5D12 con células JY que expresan CD40, medida por FACS,

#### Materiales y procedimientos

- 15 Las células JY que expresaban CD40 humano se bloquearon con suero humano al 5 % durante 30 min a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-idiotipo para mAb murino 5D12 (clon 173-36-1) se preincubó a diversas concentraciones (0 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) con ch5D12 (PG100) (1  $\mu\text{g/ml}$ ), PG102 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o anticuerpo anti-huCD86 quimérico de control negativo (chFUN-1; 1  $\mu\text{g/ml}$ ) en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ /tubo y se incubó durante 15 min. Las células JY se lavaron con tampón de FACS (1x PBS, BSA 1 % y azida sódica 0,05 %) y se descartó el sobrenadante. Las células JY se resuspendieron en tampón de FACS a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células JY a las mezclas de anticuerpo preincubadas para proporcionar un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ /tubo. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C antes de lavar con 4 ml de tampón de FACS/tubo y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de IgG-FITC diluido de cabra antihumano (Jackson Immunoresearch Labs. Cat. N°. 109-095-127) en tampón de FACS (1:100) y se incubó durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron con 4 ml de tampón de FACS y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de tampón de FACS y el anticuerpo unido se midió usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

#### Resultados

- 30 El mAb anti-idiotipo 173-36-1 inhibió la unión de PG102 y ch5D12 (PG100) con huCD40 expresado en células JY de una manera dependiente de concentración (Figura 13). La unión de chFUN-1 con CD86 que también se expresa en células JY no se vio influida por el mAb 173-36-1. No hubo diferencias significativas en el efecto de bloqueo de mAb anti-idiotipo 173-36-1 en la unión de anticuerpos específicos para CD40 con CD40 en células JY. Por ejemplo, los valores de CI50 logarítmicos calculados para la inhibición mediada por mAb 173-3-1 de ch5D12 (PG100) (Lote 1) y PG102 (Lote 2) fueron  $-5,74 \pm 0,14$  y  $-5,76 \pm 0,11$ , respectivamente, ( $p > 0,05$ ; ambos  $n=4$ ). Estos valores se corresponden con concentraciones de anti-idiotipo de aproximadamente 1,8  $\mu\text{g/ml}$  (~12 nM). La Tabla 12 muestra un resumen de los valores  $-\log\text{CI}_{50}$  calculados para la inhibición mediada por anti-idiotipo de la unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con células JY.

### Ejemplo 6

*Unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con CD-40Fc determinada por ELISA*

#### Materiales y procedimientos

- 40 Se revistieron placas de ELISA (placa de EIA/RIA Costar, Corning número de catálogo 3590) con huCD40-mulg 100  $\mu\text{l}$ /pocillo (Ansell, número de catálogo 504-020), diluido a 250 ng/ml en PBS y se incubaron durante una noche a 4 °C en un ambiente húmedo. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de lavado (Tween 20 0,05 % en PBS). Posteriormente, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo 200  $\mu\text{l}$ /pocillo (fracción V de BSA 5 % [Roche, número de catálogo 735094] en tampón de lavado) y se incubaron durante 1 h a 37 °C (ambiente húmedo).
- 45 Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Los anticuerpos de ensayo (ch5D12 (PG100), PG102, y anticuerpo quimérico de control negativo anti-huCD86 chFUN-1) se diluyeron en el intervalo de 0-1200 ng/ml en

tampón de bloqueo y se transfirieron a placas de ensayo en un volumen final de 100  $\mu$ l/pocillo, seguido de incubación durante 1 h a 37 °C (ambiente húmedo). Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado seguido de adición de 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de detección de AP de cabra antikappa humano (Southern Biotech Associate número de catálogo 2060-0) diluido 1:1000 en tampón de bloqueo. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en un ambiente húmedo antes de lavar 3 veces con tampón de lavado y un lavado único adicional con PBS. Se preparó el sustrato de PNP añadiendo un comprimido de comprimidos de *p*-nitrofenil fosfato (Sigma, número de catálogo N-2765) en 15 ml de tampón de sustrato PNP (12,1 g de Tris, 5,84 g de NaCl, 1,02 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en 1 l de H<sub>2</sub>O (ajustado a pH 9,6 con HCl). Se añadió sustrato de PNP a las placas de ensayo a 100  $\mu$ l/pocillo. Las placas se incubaron durante varios minutos (máx 30 min) a 37 °C para permitir el desarrollo del color antes de detener la reacción por adición de NaOH 3M. La intensidad del color se determinó a 405 nm usando un lector de microplacas (Biorad, modelo 550).

### Resultados

En varios experimentos independientes se descubrió que ch5D12 (PG100) y PG102 (variante I29L) diluidos en serie se unían de forma comparable a CD40-Fc inmovilizado (Figura 14), mientras que el anticuerpo de control anti-CD86 no presentaba unión apreciable con CD40-Fc. Las concentraciones de unión semimáximas calculadas para todos los experimentos se resumen en la Tabla 13. No se observaron diferencias significativas en la concentración de unión semimáxima para ninguno de los lotes de anticuerpos anti-CD40 evaluados.

### **Ejemplo 7**

*Unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con huCD40 expresado en células JY determinada por FACS*

#### **Materiales y procedimientos**

Las células JY que expresaban CD40 se lavaron con tampón de FACS (1x PBS, BSA 1 % y azida sódica 0,05 %). El sobrenadante se descartó y las células JY se resuspendieron en tampón de FACS hasta una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de la suspensión de células JY a 50  $\mu$ l de cada uno de los anticuerpos de ensayo (ch5D12 (PG100), PG102, y anticuerpo quimérico de control negativo anti-huCD86 chFUN-1) preparados en el intervalo de concentración 0-900 ng/ml y se incubaron durante 40 min a 4 °C. Las células se lavaron con 4 ml de tampón de FACS/tubo y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100  $\mu$ l de IgG-FITC de cabra antihumano (Jackson Immunoresearch Labs. Número de catálogo 109-095-127) diluido 1:100 en tampón de FACS y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron con 4 ml de tampón de FACS y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón de FACS y el anticuerpo unido se midió usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson),

### Resultados

Todos los lotes ensayados de ch5D12 (PG100) y PG102 mostraron características similares de unión con CD40 expresado en células JY (Figura 15) con concentraciones de unión de anticuerpos semimáximas comparables (Tabla 14). chFUN-1 también se unió a células JY, aunque con intensidad de fluorescencia media (IFM) menor que ch5D12 (PG100) y PG102. Esto se debe a que las células JY también expresan CD86 humano.

### Análisis

Las características de unión a CD40 de diversos lotes de PG102 (variante I29L) y ch5D12 (PG100) se han determinado usando ensayos celulares *in vitro* y basados en ELISA. La unión de PG102 y ch5D12 (PG100) con células JY que expresaban CD40 se inhibió con la misma potencia por el mAb anti-idiotipo 173-36-1. Por lo tanto, el intervalo de valores de  $-\log$  CI50 medios calculados para los lotes de PG102 y CH5D12 (PG100) fue de 5,51 a 6,11 (n=8) y 5,43 a 6,04 (n=10), respectivamente ( $p > 0,05$ ). El anticuerpo 173-36-1 se dirige contra las regiones variables del precursor de ch5D12 (PG100), mAb murino 5D12 y no inhibió la unión de un anticuerpo de control de isotipo anti-CD86. En experimentos adicionales, la concentración de unión semimáxima de PG102 y ch5D12 (PG100) se determinó por análisis de ELISA de unión de anticuerpos con CD40-Fc humano, y por análisis de FACS de la unión con células JY. En ensayos de ELISA no hubo diferencias significativas entre la concentración de unión semimáxima de PG102 y ch5D12 (PG100) para ningún lote ensayado. Por ejemplo, la media calculada de las concentraciones de unión semimáximas  $-\log$ arítmicas para los lotes de PG102 y ch5D12 (PG100) fueron  $7,47 \pm 0,04$  y  $7,54 \pm 0,03$ , respectivamente ( $P > 0,05$ , ambos n=4), correspondientes a aproximadamente 30 ng/ml. Se observaron concentraciones de unión semimáximas similares en experimentos de FACS de la unión de PG102 y ch5D12 (PG100) con CD40 expresado en células JY. Estos resultados indican que PG102 y ch5D12 (PG100) comparten el mismo paratopo de unión a CD40, como se demuestra por las características de potencia comparables del anticuerpo anti-idiotipo para la inhibición de la unión de PG102 y ch5D12 (PG100) con CD40. Además, ambos anticuerpos presentan potencias *in vitro* similares para la unión con CD40 humano en ELISA y ensayos basados en células. Juntos, los datos presentados sugieren que las propiedades de unión de PG102 y ch5D12 (PG100) con CD40 son las mismas.

**Ejemplo 8**

*Inhibición competitiva de la unión de ch5D12 (PG100)-PE y PG102-PE con células JY que expresan CD40 humano usando anticuerpo anti-CD40 no marcado*

**Materiales y procedimientos**

- 5 Se cultivaron células JY (línea celular linfoblastoide B humana transformada por virus de Epstein-Barr) en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor al 10 % (FCS), L-glutamina 2 mM y gentamicina 50 µg/ml en una atmósfera de aire humidificado que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %, a 37 °C. Las células se recogieron el día de las mediciones citométricas de flujo. Se usaron anticuerpos ch5D12 (PG100) (Lote 4) y PG102 (Lote 2) no marcados en estos experimentos. Ambos anticuerpos se usaron también en forma
- 10 marcada con PE para determinación directa de la unión con células JY por citometría de flujo. Los anticuerpos se marcaron a medida con PE por AbD Serotec (Oxford, Reino Unido). Para cada análisis de FACS se usó el siguiente protocolo. Se recogieron células JY del cultivo celular y se contaron. Posteriormente se incubaron  $1 \times 10^5$  células JY que expresaban CD40/200 µl de tampón de incubación (PBS, BSA 1 %, azida sódica 0,05 %) con anticuerpos
- 15 ch5D12 (PG100) o PG102 marcados 1 µg/ml, en presencia de diversa concentración (0-10 µg/ml) de ch5D12 (PG100) o PG102 competidores no marcados, durante 30 min a 4-8 °C. Las células se lavaron, seguido de análisis citométrico de flujo en el que se determinó la IFM a cada concentración usando un citómetro de flujo FACScan (Becton & Dickinson). Se midieron cinco mil acontecimientos/muestra y se analizaron usando software CellQuest® (Becton & Dickinson).

**Resultados**

- 20 Los anticuerpos ch5D12 (PG100) y PG102 no marcados presentaron características inhibitorias similares en estos ensayos (Figura 16). Los valores de  $-\log CI_{50}$  medios para la inhibición de la unión de ch5D12 (PG100) 1 µg/ml por ch5D12 (PG100) y PG102 no marcado fueron  $7,50 \pm 0,03$  y  $7,63 \pm 0,03$ , respectivamente (ambos  $n=4$ ), mientras que los valores de  $-\log CI_{50}$  medios para la inhibición de la unión de PG102 1 µg/ml por ch5D12 (PG100) y PG102 no marcados fueron  $7,54 \pm 0,01$  y  $7,65 \pm 0,02$ , respectivamente (ambos  $n=4$ ). Estos valores de  $-\log CI_{50}$  se corresponden a las concentraciones de PG102 y ch5D12 (PG100) superiores de aproximadamente 20-30 ng/ml (es decir ~130-200 pM).
- 25

**Ejemplo 9**

*Inhibición de la liberación de IL-8 de células THP-1*

**Materiales y procedimientos**

- 30 La funcionalidad de PG102 se midió usando un bioensayo funcional basado en células. Brevemente, el día 1, se cultivaron células humanas THP-1 y Jurkat 39,8/50 en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM, BioWhittaker, número de catálogo BE 12-722F) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco, ref. 10270-106) y gentamicina 50 µg/ml (Invitrogen, número de catálogo 15750-045). Las células THP-1 se sometieron a pulsos con rhuIFN- $\gamma$  a 1000 unidades/ml de cultivo celular.
- 35 El día 3 del bioensayo se requerían células THP-1 y Jurkat 39,8/50 a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml. Se contaron las células THP-1 y J39,8/50 y se determinó su viabilidad. Después las células se diluyeron a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, las suspensiones celulares se mezclaron 1:1 y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificada durante 48 h.
- 40 El día 3 las células THP-1 y J39,8/50 se lavaron como sigue (en el caso de las células THP-1 la etapa de lavado fue para retirar el IFN- $\gamma$ ): se transfirieron 5 ml de suspensión de células THP-1 y J39,8/50 pulsadas con IFN- $\gamma$  a un tubo falcon de 50 ml. Se añadieron 40 ml de Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS) y las células se centrifugaron a 1500 rpm (usando una centrífuga IEC) durante 6 min. El sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió en IMDM previamente calentado complementado con FCS 10 %. Las células THP-1 y células J39,8/50 se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml.
- 45 Para ensayos de inhibición la muestra de ensayo ch5D12 (PG100) o PG102 (variante I29L) se diluyó en serie en medio IMDM calentado complementado con suero bovino fetal al 10 % para obtener concentraciones de ensayo finales en el intervalo de 0 - 160 ng/ml. Las THP-1, J39,8/50 y la muestra o las muestras de ensayo se añadieron por triplicado a placas de cultivo celular de fondo redondo (Nuncclon™) en el siguiente orden: 50 µl de células THP-1 (equivalentes a  $2 \times 10^4$  células por pocillo), 50 µl de la muestra de ensayo y 50 µl de células J39,8/50. El volumen total fue de 150 µl por pocillo. Las placas de cultivo celular se envolvieron en película adherente porosa y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificada durante 48 h.
- 50

El día 5, después de un periodo de cultivo de 48 h, se aspiraron 70 µl de sobrenadantes de cultivo celular y se transfirieron a una placa de microtitulación de fondo redondo. Los sobrenadantes de cultivo celular recogidos se ensayaron con respecto al contenido de IL-8 usando un ELISA comercial (Biosource, cytoset de IL-8 humana,



número de catálogo CHC1304) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

5 PG102 (variante I29L) y ch5D12 (PG100) mostraron efectos inhibidores similares en liberación de IL-8 suscitada por células THP-1 (Figura 17), los valores calculados de  $-\log CI_{50}$  para los dos anticuerpos fueron 8,42 y 8,28, respectivamente. Estos valores corresponden a concentraciones  $CI_{50}$  de aproximadamente 30 pM.

**Ejemplo 10**

10 Un estudio de reactividad cruzada de tejido previo en tejidos humanos y de cynomolgus mostró que ch5D12 (PG100) se unía a la superficie celular de linfocitos B y DC en órganos linfoides. No se observó reactividad cruzada inesperada en tejidos humanos o de cynomolgus. Este estudio se repitió para PG102 y se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados) lo que indica que ch6D12 (PG100) y PG102 se unen a una diversidad de secciones tisulares de una manera similar.

15 También se realizó una evaluación de seguridad y tolerabilidad previa para ch5D12 en monos cynomolgus, en la que se mostró que la administración semanal de ch5D12 durante 4 semanas era segura y sin ningún efecto secundario en todos los monos. En este estudio, se obtuvieron pruebas funcionales de que ch5D12 puede evitar la activación y proliferación de linfocitos B<sup>27</sup>. Se repitieron estudios de seguridad para PG102 usando un protocolo más prolongado. Brevemente, se diseñó un estudio de toxicidad intravenosa de 13 semanas en monos cynomolgus con un periodo de recuperación de 14 semanas, usando 3 niveles de dosis (0, 25 y 100 mg/kg i.v.) y 26 monos (6 monos (3M, 3F) por grupo de tratamiento, más 4 monos (2M, 2F) como grupos de recuperación en cada rama de tratamiento activo). Se realizaron las siguientes mediciones: TK, respuesta anti-PG102, citometría de flujo (incluyendo revestimiento con CD40 de PBMC), biopsia de ganglios linfáticos y evaluaciones de toxicología convencional tales como hematología e inmunohistoquímica.

20 Los resultados de este estudio demostraron que no se observa toxicidad para ninguno de los niveles de dosis ensayados. PG102 era seguro y se toleraba bien.

25 Colectivamente estos estudios demuestran que el Mab antagonista anti CD40 humano PG102, como su anticuerpo parental ch5D12 (PG100), no tiene reactividad cruzada inesperada, y es seguro y se tolera bien *in vivo*.

**Tabla 1**

Tabla 1. Demografía de línea basal por cohorte

Cohorte	Dosis de ch5D12 (mg/kg)	Sexo M/F	Edad media	Peso medio (kg)	Longitud media (cm)	IMC medio	CDAI medio	CDRIS medio
1	0,3	1/4	30	57	164	21	301	16 (n = 2)
2	1,0	2/3	43	72	169	25	276	14 (n = 1)
3	1,0	1/4	34	65	168	23	292	15 (n = 5)
4	10,0	3/0	34	70	170	24	331	15 (n = 3)
Total		7/11	35	65	167	23	300	15 (n = 11)

IMC, Índice de masa corporal; CDAI, Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn; CDEIS, Índice de Gravedad Endoscópico de Enfermedad de Crohn.

**Tabla 2**

Tabla 2. Reducciones de las puntuaciones del Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn después de tratamiento con ch5D12

Sujeto	CDAI en la exploración	Reducción de CDAI el día 28	Reducción de CDAI máxima <sup>a</sup>	Día de máxima reducción de CDAI	Remisión (sí/no) <sup>b</sup>	Día de remisión
Cohorte 1: ch5D12 0,3 mg/kg						
001	253	-30	41	7	No	-
002	274	57	107	21	No	-
003	320	86	129	14	No	-
004	392	58	66	7	No	-
005	265	117	149	14	Sí	14
Media	301	58	98	12,6		
Cohorte 2: ch5D12 1 mg/kg						
006	232	-43	69	7	No	-
007	228	133	175	21	Sí	21
008	394	144	172	21	No	-
009	288	56	123	21	No	-
010 <sup>c</sup>	241	-42	Sin reducción	-	No	-
Media	277	50	108	14		
Cohorte 3: ch5D12 3 mg/kg						
011	299	27	27	28	No	-
012	308	194	194	28	Sí	28
013	280	106	106	28	No	-
014	327	-84	147	14	No	-
015	249	103	103	28	No	-
Media	293	69	115	25,2		
Cohorte 4: ch5D12 10 mg/kg						
016	357	-65	109	21	No	-
017	358	302	301	28	Sí	14
018	280	20	102	21	No	-
Media	332	86	171	23,3		

<sup>a</sup> Reducción máxima de CDAI durante el periodo de observación de 28 días después de la infusión de ch5D12,

<sup>b</sup> La remisión se definió como una mutación de CDAI total de  $\leq 150$  y una reducción de  $> 100$ .

<sup>c</sup> Todos los sujetos mostraron una reducción de su puntuación CDAI excepto para el sujeto 010 (cohorte de 1,0 mg/kg). Este sujeto tuvo una puntuación de exploración de 241,4 y la puntuación de CDAI nunca bajo por debajo del valor obtenido en la exploración.

CDAI. Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn.

**Tabla 3**

Tabla 3. Puntuación inmunohistoquímica<sup>a</sup>

ID del sujeto	Cohorte (mg/kg)	Origen de la muestra	CD3		CD4		CD8		CD19		CD68		
			0	28	0	28	0	28	0	28	0	28	
001	0,3	Íleon	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
		Colon	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
005	0,3	Íleon	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
		Colon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
009	1,0	Íleon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
011	3,0	Íleon	++	+	++	+	++	+	+	+	+	++	+
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
012	3,0	Íleon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
		Colon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
013	3,0	Íleon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
		Colon	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
014	3,0	Íleon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
015	3,0	Íleon	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
016	10	Íleon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
017	10	Íleon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Colon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
018	10	Íleon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Colon	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++

Resultados de linfocitos. 0 = exploración. 28 = día 28.

NM. No hay muestra

<sup>a</sup> Todas las biopsias disponibles se tiñeron con anticuerpos que reconocían todos los linfocitos T (CD3), linfocitos T auxiliares (CD4), linfocitos T citotóxicos (CD8), linfocitos B (CD19) y macrófagos (CD68). El valor para CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> tanto para íleon como para colon del tejido no inflamado es positivo sencillo (+).

**Tabla 4**

cebador	secuencia 5'- 3'
<b>Q5E</b>	ctcccaggtaagcttgaggagtctggacctgg
<b>Q5Einv</b>	ccagggtccagactcctcaagcttaacctgggag
<b>K13A</b>	gacctggcctgggtggcaccctcagagacct
<b>K13Ainv</b>	gggtctctgagggtgccaccaggccaggtc
<b>E16Q</b>	cctggtgaaaccctcacagaccctgtccatcac
<b>E16Qinv</b>	gtgatggacagggctgtgagggttcaccagg
<b>T17S</b>	gtgaaaccctcagagagcctgtccatcacatgc
<b>T17Sinv</b>	gcatgtgatggacaggctctctgagggtttcac
<b>I29L</b>	gcactgtctctgggttctcactctccagatatagtgtatac
<b>I29Linv</b>	gtatacactatactggagagtgagaaccagagacagtg
<b>I37V</b>	gataatgtatactgggttcgaccagcctccagg
<b>I37Vinv</b>	cctggaggctggcgaaccagatatacactatac
<b>P45L</b>	cctccaggaaagggctggagtggatgggaatg
<b>P45Linv</b>	cattccatccactccagacccttctctggagg
<b>M48L</b>	gggtccggagtggctgggaatgatgtg
<b>M48Linv</b>	cacatcattcccagccactccggagacc
<b>STS60NSA</b>	gtgggtgtccacagactataattcagctctcaaatccagactgacc
<b>STS60NSAinv</b>	ggtcagctctgattgagagctgaattatagctgtggaaccaccac
<b>T68S</b>	ctcaaatccagactgagcatcagcaaggacacc
<b>T68Sinv</b>	gggtccttgctgatgctcagctctggattgag
<b>S79F</b>	cacctgaagagccaggtctcttaaaaatgaacagtctgc
<b>S79Finv</b>	gcagactgttcattttaagaagacctggctcttcgaggtg
<b>T108S</b>	gggtcaaggaacctcgggtcaccgtctc
<b>T108Sinv</b>	gagacggtgaccgaggtccttgacc

Oligonucleótidos mutagénicos. Oligonucleótidos usados para introducir las mutaciones en la posición de aminoácido 5, 13, 16, 17, 29, 37, 45, 48, 60, 68, 79 y 108. Para cada posición es necesario un oligonucleótido sentido y uno antisentido ("inv").

5

**Tabla 5**

variante	FACS IFM	ELISA ng/ml	Relación
Q5E	39	444	20
K13A	31	267	12
E16Q	39	420	19
T17S	33	482	22
I29L	108	1331	
I37V	96	1175	
P45L	82	566	26
M48L	8	525	24
STS60NSA	62	308	14
T68S	35	295	13
S79F	96	869	40
T108S	99	648	30
CH5D12	103	2187	
DI5D12	50	392	18
simulado	11	n.d.	
blanco	10	n.d.	

Visión del conjunto de los datos de expresión como se miden por FACS y ELISA cuantitativo. Para cada variante 5D12 (Q5E, K13A, E16Q, T17S, I29L, I37V, P45L, M48L, STS60NSA, T68S, S79F y T108S) junto con ch5D12 y DI5D12 se muestra el valor de IFM (como se determina por FACS) y la concentración de anticuerpo en el sobrenadante recogido (como se determina por ELISA). También se muestran valores de IFM para transfección simulada y control de medio. La relación se calcula usando los datos de ELISA en comparación con el valor de ch5D12 (indicado como el 100 %).

10

**Tabla 6:** oligonucleótidos mutagénicos. Oligonucleótidos usados para introducir las mutaciones en las posiciones de aminoácidos 29 y 37. Se enumeran los oligonucleótidos sentido y antisentido (inv).

Cebador	secuencia 5'-3'
I29V	gcactgtctctgggttctcagtcctagatagtgatac
I29Vinv	gtatacactatatactagagactgagaaccagagacagtgc
I29L	gcactgtctctgggttctcactctccagatagtgatac
I29Linv	gtatacactatatactggagagtgagaaccagagacagtgc
I37L	gatatagtgtatactggctgcgccagcctccagg
I37Linv	cctggaggctggcgcagccagtatacactatatac
I37V	gatatagtgtatactgggttcgccagcctccagg
I37Vinv	cctggaggctggcgaaccaggtatacactatatac

5 **Tabla 7:** la creación de dobles mutantes requirió 2 ciclos de mutagénesis. A continuación se enumera qué conjuntos de cebadores se usaron en la etapa 1 y etapa 2 respectivamente para llegar a las variantes DI5D12 adicionales.

Mutante	Etapas 1	Etapas 2
PG102 [29L-37I (LI)]	I29L+I29Linv	n.d.
29I-37V (IV)	I37V+I37Vinv	n.d.
29V-37I (VI)	I29V+I29Vinv	n.d.
29I-37L (IL)	I37L+I37Linv	n.d.
29V-37V (VV)	I29V+I29Vinv	I37V+I37Vinv
29L-37L (LL)	I29L+I29Linv	I37L+I37Linv
29V-37L (VL)	I29V+I29Vinv	I37L+I37Linv
29L-37V (LV)	I29L+I29Linv	I37V+I37Vinv

**Tabla 8:** Datos de expresión como se miden por ELISA cuantitativo. Para cada variante de 5D12 adicional (29I-37V, 29V-37I, 29I-37L, 29V-37V, 29L-37L, 29V-37L y 29L-37V), junto con ch5D12 (PG100), DI5D12 y PG102 (variante I29L), se muestra la concentración de anticuerpos en el sobrenadante recogido.

variante	nombre	ELISA (ng/ml)
29L-37V	ch5D12 (PG100)	2846
29I-37I	DI5D12	587
29L-37I	PG102	2226
29I-37V		1728
29V-37I		928
29I-37L		729
29V-37V		2027
29L-37L		1115
29V-37L		891
29L-37V		4263

**Tabla 9:** Resumen de datos de crecimiento y productividad de líneas celulares CHO en cultivos de matraz de agitación semicontinuos CDACF

ID de cultivo	Concentración celular viable máxima $10^6$ células/ml	Integral con respecto al tiempo de la concentración de células viables $10^9$ células, h/l	Concentración del producto en la recogida mg/l	Tasa de producción específica ( $q_p$ recogida) $\text{mg}/10^9$ células/h	Tasa de producción específica ( $q_p$ global) $\text{mg}/10^9$ células/h
L107 (DC1)	9,66	2201	1674	0,76	0,78
L25 (DC2)	11,06	2610	1258	0,48	0,48
M95 (DC3)	9,58	2146	1173	0,55	0,58
L52	13,45	2989	1001	0,33	0,34
L73	5,95	1325	936	0,71	0,77
L45	10,48	2096	915	0,44	0,45
J3	9,20	2012	888	0,44	0,48
J4	11,02	2037	871	0,43	0,45
L97	7,55	1821	819	0,45	0,53
M92	7,82	1665	807	0,48	0,53
M59	14,65	3270	792	0,24	0,24
L102	6,20	1282	733	0,57	0,60
M58	8,78	1970	662	0,34	0,39
G20	5,73	1391	658	0,47	0,52
L65	3,74	878	651	0,74	0,90
L56	8,52	1728	546	0,32	0,30
M63	10,79	2465	444	0,18	0,18
G7	9,87	2058	376	0,18	0,20
G11	5,04	1145	310	0,27	0,30
L1	5,78	1163	263	0,23	0,21
M15	11,23	2654	121	0,05	0,04
M54	9,95	2278	276	0,12	0,15
M56	11,56	2347	27	0,01	0,01

**Tabla 10:** Análisis de GP-HPLC (incluyendo LMWC)

Número de Muestra	ID del Cultivo	Área Máxima Relativa ( %)			
		Agregado Total	Monómero	Fragmento	LMWC
1	<b>L107</b>	0,62	84,8	ND	14,58
2	<b>L25</b>	0,65	76,5	ND	22,88
3	<b>M95</b>	0,74	84,7	ND	14,60
4	<b>L52</b>	0,94	72,0	ND	27,07
5	<b>L73</b>	1,48	87,9	ND	10,63
6	<b>J3</b>	1,01	92,5	ND	6,48
7	<b>J4</b>	1,68	73,4	0,04	24,91
8	<b>L97</b>	1,66	84,4	ND	13,92
9	<b>M92</b>	1,18	89,4	ND	9,42
ND = No Detectado					

**Tabla 11:** Análisis de GP-HPLC (solamente productos de IgG)

Número de Muestra	ID del Cultivo	Área Máxima Relativa ( %) sin LMWC		
		Agregado Total	Monómero	Fragmento
1	<b>L107</b>	0,72	99,3	ND
2	<b>L25</b>	0,84	99,2	ND
3	<b>M95</b>	0,87	99,1	ND
4	<b>L52</b>	1,28	98,7	ND
5	<b>L73</b>	1,66	98,3	ND
6	<b>J3</b>	1,08	98,9	ND
7	<b>J4</b>	2,24	97,7	0,05
8	<b>L97</b>	1,93	98,1	ND
9	<b>M92</b>	1,30	98,7	ND
10	<b>M59</b>	1,79	98,2	ND
ND = No Detectado				

**Tabla 12:** Resumen de los valores -log CI50 calculados para la inhibición mediada por anti-idiotipo de la unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con células JY. Los datos indican la media ± e.t. de la media de n determinaciones. No hubo diferencias significativas en la potencia inhibidora del anti-idiotipo con ninguno de los lotes de anticuerpos ensayados ( $p > 0,05$ , ANOVA seguido de ensayo de Tukey para comparaciones múltiples).

mAb Anti-CD40 (lote)	-log CI50	n
ch5D12 (PG100) (Lote 1)	5,74 ± 0,14	4
ch5D12 (PG100) (Lote 2)	5,64 ± 0,01	2
ch5D12 (PG100) (Lote 3)	5,55 ± 0,06	2
ch5D12 (PG100) (Lote 4)	5,63 ± 0,02	2
PG102 (Lote 1)	5,85 ± 0,12	4
PG102 (Lote 2)	5,76 ± 0,11	4

5

**Tabla 13:** Resumen de los valores de concentración de unión semi-máximos -log calculados para la unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con CD40-Fc humano, como se determina por ELISA. Los datos indican la media ± e.t. de la media de n determinaciones. No hubo diferencias significativas en la unión de ningún lote de anticuerpo ensayado ( $p > 0,05$ , ANOVA seguido de ensayo de Tukey para comparaciones múltiples). Para referencia, una concentración de unión semi-máxima -log de 7,45 se corresponde con una concentración de 35 ng/ml (~ 200 pmol).

10

mAb Anti-CD40 (lote)	Concentración de unión semi-máxima -log	n
ch5D12 (PG100) (Lote 1)	7,54 ± 0,03	4
ch5D12 (PG100) (Lote 2)	7,53 ± 0,02	2
ch5D12 (PG100) (Lote 3)	7,48 ± 0,10	2
ch5D12 (PG100) (Lote 4)	7,37 ± 0,10	2
PG102 (Lote 1)	7,45 ± 0,04	4
PG102 (Lote 2)	7,47 ± 0,04	4

**Tabla 14:** Resumen de los valores de concentración de unión semi-máxima -log calculados para la unión de ch5D12 (PG100) y PG102 con células JY que expresan CD40 humano, como se determina por ELISA. Los datos indican la media de determinaciones por duplicado. Para referencia, una concentración de unión semi-máxima -log de 7,45 se corresponde con una concentración de 35 ng/ml (~ 200 pmol).

15

mAb Anti-CD40 (lote)	Concentración de unión semi-máxima -log	n
ch5D12 (PG100) (Lote 1)	7,26	2
ch5D12 (PG100) (Lote 2)	7,34	2
ch5D12 (PG100) (Lote 3)	7,49	2
ch5D12 (PG100) (Lote 4)	7,59	2
PG102 (Lote 1)	7,44	2
PG102 (Lote 2)	7,48	2



**Referencias:**

- 1 Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* (1993); 177:925-35.
- 5 2 Hasbold J, Johnson-Leger C, Atkins CJ, Clark EA, Klaus GGB. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur J Immunol* (1994); 24: 1835-42.
- 3 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* (1993); 178: 669-74.
- 10 4 Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* (1995); 155: 4917-25.
- 5 Shu U, Kuniwa M, Wu CY, y col. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1995); 25: 1125-8.
- 15 6 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* (1996); 184: 747-52.
- 7 van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* (1997); 9: 330-7.
- 8 Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* (1994); 152: 1523-31.
- 20 9 Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40 ligand-positive CD8+ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* (1995); 25: 2972-7.
- 10 rewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* (1998); 16: 111-35.
- 11 Henn V, Slupsky JR, Grafe M, y col. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* (1998); 391: 591-4.
- 25 12 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* (2000); 67: 2-17.
- 13 Clegg CH, Rulfes JT, Haugen HS, y col. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int Immunol* (1997); 9: 1111-22.
- 14 Stüber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* (1996); 183: 693-8.
- 30 15 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, y col. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J Immunol* (2000); 164: 6005-14.
- 16 De Jong YP, Comiskey M, Kalled SL, y col. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. *Gastroenterology* (2000); 119: 715-23.
- 35 17 Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* (2000); 6: 114.
- 18 Buhler L, Alwayn IP, Appel JZ III, Robson SC, Cooper DK. Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism. *Transplantation* (2001); 71: 491.
- 19 Knosalla C, Gollackner B, Cooper DK. Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism revisited. *Transplantation* (2002); 74: 416-17.
- 40 20 de Boer M, Conroy J, Min HY, Kwekkeboom J. Generation of monoclonal antibodies to human lymphocyte cell surface antigens using insect cells expressing recombinant proteins. *J Immunol Meth* (1992); 152: 15-23.
- 21 Kwekkeboom J, de Boer M, Tager JM, de Groot C. CD40 plays an essential role in the activation of human B cells by murine EL4B5 cells. *Immunology* (1993); 79: 439-44.
- 45 22 Kwekkeboom J, de Rijk D, Kasran A, Barcy S, de Groot C, de Boer M. Helper effector function of human T cells stimulated by anti-CD3 Mab can be enhanced by co-stimulatory signals and is partially dependent on

- CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1994); 24: 508-17.
- 23 Laman JD, 't Hart BA, Brok, HPM, y col. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* (2002); 32: 2218-28.
- 5 24 Boon L, Brok HPM, Bauer J, y col. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist Mab against human CD40 is associated with altered B-cell responses. *J Immunol* (2001); 167: 2942-9.
- 25 Haanstra KG, Ringers J, Sick EA, y col. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* (2003); 75: 637-43.
- 10 26 Haegel-Kronenberger H, Haanstra K, Ziller-Remy C, y col. Inhibition of costimulation allows for repeated systemic administration of adenoviral vector in rhesus monkeys. *Gene Ther* (2004); 11: 241-52.
- 27 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, y col. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. *Toxicology* (2002); 174: 53-65.
- 28 Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* (1997); 92: 5S-11S.
- 15 29. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* (1998); 15: 182-205.
- 30 Burgio VL, Fais S, Boirivant M, Perrone A, Pallone F. Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease. *Gastroenterology* (1995); 109: 1029-38.
- 31 Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* (1994); 35: 669-74.
- 20 32 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, y col. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. *J Immunol* (1996); 157: 1261-70.
- 33 Mullin GE, Maycon ZR, Braun-Elwert L, y col. Inflammatory bowel disease mucosal biopsies have specialized lymphokine mRNA profiles. *Inflam Bowel Dis* (1996); 2: 16-26.
- 25 34 Pospai, D, Rene E, Fiasse R, y col. Crohn's disease stable remission after human immunodeficient virus infection. *Dig Dis Sci* (1998); 43: 412-9.
- 35 Stronkhorst A, Radema S, Yong SL, y col. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. *Gut* (1997); 40: 320-7.
- 36 Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* (1993); 75: 253-61.
- 30 37 Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller K. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* (1993); 75: 263-74.
- 38 Powrie F, Leach MM, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RA. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* (1994); 1: 553-62.
- 35 39 Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, y col. Hyperexpression of CD40 Ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its role in pathogenic cytokine production. *J Immunol* (1999); 163: 4049-57.
- 40 D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum in Crohn's disease. *Gastroenterology* (1998); 114: 262-7.
- 40 41 Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, y col. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment*

- Pharmacol Ther (2001); 15: 2041-2.
- 42 Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* (2003); 92: 1041-8.
- 5 43 Van Assche G, Rutgeerts P. Anti-TNF agents in Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs* (2000); 9: 103-11.
- 44 Stüber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* (1996); 183: 693-698.
- 45 Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* (1993); 177: 925-935.
- 10 46 Hasbold J, Johnson-Leger C, Atkins CJ, Clark EA, Klaus GGB. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur J Immunol* (1994); 24: 1835-1842.
- 47 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* (1993); 178: 669-674:
- 15 48 Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* (1995); 155: 4917-4925.
- 49 Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1995); 25: 1125-1128.
- 20 50 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* (1996); 184: 747-752.
- 51 van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* (1997); 9: 330-337.
- 25 52 Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* (1994); 152: 1523-1531.
- 53 Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40 ligand-positive CD8+ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* (1995); 25: 2972-2977.
- 30 54 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* (1998); 16: 111-135.
- 55 Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* (1998); 391: 591-594.
- 56 Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* (1994); 12: 881-922.
- 35 57 Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand gp39. *Annu Rev Immunol* (1996); 14: 591-617.
- 58 Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* (1996); 156: 3932-3938.
- 40 59 Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- $\alpha$ , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* (1995); 25: 1943-1950.

- 60 Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteche CM, Simoneaux DK, Fanshow WC, Belmont J, Spriggs MK. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* (1993); 259: 990-993.
- 5 61 Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ; Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* (1994); 1: 423-431.
- 62 Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* (1995); 378: 617-620.
- 63 Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* (1996); 156: 8-11.
- 10 64 Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafó V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrabamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* (1997); 131: 47-54.
- 15 65 Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, McMahon-Pratt D, Flavell RA. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* (1996); 4: 263-273.
- 66 Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* (1996); 4: 283-289.
- 20 67 Clegg CH, Rulfes JT, Haugen HS, Hoggatt IH, Aruffo A, Durham SK, Farr AG, Hollenbaugh D. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int Immunol* (1997); 9: 1111-1122.
- 68 Parker y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 9560
- 69 Haanstra KG, Ringers J, Sick EA, Ramdien-Murli S, Kuhn EM, Boon L, Jonker M. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation*. (2003); 75(5): 637-43.
- 25 70 Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, Wubben JAM, Kuhn EM, Boon L, Jonker M. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of Rhesus Monkey kidney allografts. *Transplantation*. (2005); 79: 1623-1626.
- 30 71 Boon L, Brok HP, Bauer J, Ortiz-Buijsse A, Schellekens MM, Ramdien-Murli S y col. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses. *J Immunol* (2001); 167: 2942-2949.
- 72 Laman JD, 't Hart BA, Brok H, Meurs M, Schellekens MM, Kasran A y col. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* (2002); 32: 2218-2228.
- 35 73 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, den Hartog MT, Hoffenberg S, Liu P y col. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. *Toxicology* (2002); 174: 53-65.
- 74 Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. (2005); 22: 111-22.
- 40 75 Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, Wubben JA, Kuhn EM, Boon L, Jonker M. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts. *Transplantation*. (2005); 79: 1623-6.
- 76 't Hart BA, Blezer EL, Brok HP, Boon L, de Boer M, Bauer J, Laman JD. Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE. *J Neuroimmunol*. (2005); 163: 31-9.

- 77 Koenen HJ, den Hartog MT, Heerkens S, Fasse E, Ortiz-Buijsse A, van Neerven RJ, Simons PJ, Joosten I, Boon L. A novel bispecific antihuman CD40/CD86 fusion protein with t-cell tolerizing potential. *Transplantation*. (2004); 78:1429-38.
- 5 78 de Vos AF, Melief MJ, van Riel D, Boon L, van Eijk M, de Boer M, Laman JD. Antagonist anti-human CD40 antibody inhibits terminal center formation in cynomolgus monkeys. *Eur J Immunol*. (2004); 34: 3446-55.
- 79 Laman JD, 't Hart BA, Brok H, Meurs M, Schellekens MM, Kasran A, Boon L, Bauer J, Boer M, Ceuppens J. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol*. (2002); 32: 2218-28.
- 10 80 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, den Hartog MT, Hoffenberg S, Liu P, Shiao F, de Boer M. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. *Toxicology*. (2002); 174: 53-65.
- 81 Boon L, Brok HP, Bauer J, Ortiz-Buijsse A, Schellekens MM, Ramdien-Murli S, Blezer E, van Meurs M, Ceuppens J, de Boer M, 't Hart BA, Laman JD. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callitrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses. *J Immunol*. (2001); 167: 2942-9.
- 15 82 S.G. Antunes, N.G. de Groot, H. Brok, G. Doxiadis, A.A. Menezes, N. Otting y R.E. Bontrop, The common marmoset: a new world primate species with limited Mhc class II variability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998); 95: 11745-11750.
- 83 B. Becher, B.G. Durell, A.V. Miga, W.F. Hickey y R.J. Noelle, The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system, *J. Exp. Med.* (2001); 193: 967-974.
- 20 84 R.E. Bontrop, N. Otting, N.G. de Groot y G.G. Doxiadis, Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates, *Immunol. Rev.* (1999); 167: 339-350.
- 85 H.P. Brok, A. Uccelli, N. Kerlero De Rosbo, R.E. Bontrop, L. Roccatagliata, N.G. de Groot, E. Capello, J.D. Laman, K. Nicolay, G.L. Mancardi, A. Ben-Nun y B.A. 't Hart, Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: the encephalitogenic T cell epitope pMOG24-36 is presented by a monomorphic MHC class II molecule, *J. Immunol.* (2000); 165: 1093-1101.
- 25 86 H.P. Brok, J. Bauer, M. Jonker, E. Blezer, S. Amor, R.E. Bontrop, J.D. Laman y B.A. 't Hart, Non-human primate models of multiple sclerosis, *Immunol. Rev.* (2001); 183: 173-185.
- 87 C.P. Genain y S.L. Hauser, Experimental allergic encephalomyelitis in the New World monkey *Callithrix jacchus*, *Immunol. Rev.* (2001); 183: 159-172.
- 30 88 K. Gerritse, J.D. Laman, R.J. Noelle, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, W.J. Boersma y E. Claassen, CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996); 93: 2499-2504.
- 89 A.M. Girvin, M.C. Dal Canto y S.D. Miller, CD40/CD40L interaction is essential for the induction of EAE in the absence of CD28-mediated costimulation, *J. Autoimmun.* (2002); 18: 83-94.
- 35 90 I.S. Grewal y R.A. Flavell, A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses, *Immunol. Today* (1996); 17: 410-414.
- 91 L.M. Howard, A.J. Miga, C.L. Vanderlugt, M.C. Dal Canto, J.D. Laman, R.J. Noelle y S.D. Miller, Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* (1999); 103: 281-290.
- 40 92 E.K. Jordan, H.I. McFarland, B.K. Lewis, N. Tresser, M.A. Gates, M. Johnson, M. Lenardo, L.A. Matis, H.F. McFarland y J.A. Frank, Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the common marmoset, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* (1999); 20: 965-976.

- 93 J.D. Laman, E. Claassen y R.J. Noelle, Functions of CD40 y its ligand, gp39 (CD40L), *Crit. Rev. Immunol.* (1996); 16: 59-108.
- 5 94 J.D. Laman, C.B. Maassen, M.M. Schellekens, L. Visser, M. Kap, E. de Jong, M. van Puijenbroek, M.J. van Stipdonk, M. van Meurs, C. Schwarzler y U. Gunthert, Therapy with antibodies against CD40L (CD154) and CD44-variant isoforms reduces experimental autoimmune encephalomyelitis induced by a proteolipid protein peptide, *Mult. Scler.* (1998); 4: 147-153.
- 95 J.D. Laman, M. van Meurs, M.M. Schellekens, M. de Boer, B. Melchers, L. Massacesi, H. Lassmann, E. Claassen y B.A. 't Hart, Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*), *J. Neuroimmunol.* (1998); 86: 30-45.
- 10 96 J. Mestas y C.C. Hughes, Of mice and not men: differences between mouse and human immunology, *J. Immunol.* (2004); 172: 2731-2738.
- 97 S.A. Quezada, L.Z. Jarvinen, E.F. Lind y R.J. Noelle, CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity, *Annu. Rev. Immunol.* (2004); 22: 307-328.
- 15 98 C.S. Raine, B. Cannella, S.L. Hauser y C.P. Genain, Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation, *Ann. Neurol.* (1999); 46: 144-160.
- 99 D.H. Sachs, Tolerance: of mice and men, *J. Clin. Invest.* (2003); 111: 1819-1821.
- 100 E.B. Samoilova, J.L. Horton, H. Zhang y Y. Chen, CD40L blockade prevents autoimmune encephalomyelitis and hampers TH1 but not TH2 pathway of T cell differentiation, *J. Mol. Med.* (1997); 75: 603-608.
- 20 101 B.A. 't Hart, J. Bauer, H.J. Muller, B. Melchers, K. Nicolay, H. Brok, R.E. Bontrop, H. Lassmann y L. Massacesi, Histopathological characterisation of magnetic resonance imaging-detectable brain white matter lesions in a primate model of multiple sclerosis: a correlative study in the experimental autoimmune encephalomyelitis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*), *Am. J. Pathol.* (1998); 153: 649-663.
- 25 102 B.A. 't Hart, M. van Meurs, H.P. Brok, L. Massacesi, J. Bauer, L. Boon, R.E. Bontrop y J.D. Laman, A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset, *Immunol. Today*(2000); 21: 290-297.
- 103 B. 't Hart, S. Amor y M. Jonker, Evaluating the validity of animal models for research into therapies for immunebased disorders, *Drug Discov. Today* (2004); 9: 517-524.
- 104 't Hart y col., 2004b B.A. 't Hart, J.D. Laman, J. Bauer, E.D. Blezer, Y. van Kooyk y R.Q. Hintzen, Modelling of multiple sclerosis: lessons learned in a non-human primate, *Lancet Neurol* (2004); 3: 589-597.
- 30 105 B.A. 't Hart, J. Vogels, J. Bauer, H.P. Brok y E. Blezer, Non-invasive measurement of brain damage in a primate model of multiple sclerosis, *Trends Mol. Med.* (2004); 10: 85-91.
- 106 B.A. 't Hart, J.T. Vogels, J. Bauer, H.P.M. Brok y E. Blezer, Non-invasive measurement of brain damage in a primate model of multiple sclerosis, *Trends Mol. Mend.* (2004); 10: 85-91.
- 35 107 P. Villoslada, K. Abel, N. Heald, R. Goertsches, S.L. Hauser y C.P. Genain, Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates, *Eur. J. Immunol.* (2001); 31: 2942-2950.
- 108 Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Intralesional T-lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* (1995); 105(1 Suppl): 89S-94S.
- 40 109 Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* (1999); 20: 40-46.
- 110 Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet* (2003); 361: 1197-1204.

111 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* (2000); 67: 2-17.

112 Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Moulon C, y col. CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J Immunol* (1997); 158: 144-152.

5 113 Denfeld RW, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, y col. CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur J Immunol* (1996); 26: 2329-2334.

114 Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish J, Phipps RP. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol* (1996); 26: 1371-1377.

10 115 Pasch MC, Bos JD, Asghar SS. Activation of complement from psoriasis. *Clin Exp Dermatol* (1998); 23: 189-190.

116 Pasch MC, Timar, K, van Meus M, Heyendaal VMR, Bos JD, Laman JD, Ashgar SS. In situ demonstration of CD40- and CD154-positive cells in psoriatic lesions and keratinocyte production of chemokines by CD40 ligation in vitro. *J. Pathol* (2004); 203: 839-848.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-CD40 que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL <sub>1</sub> SI TCTVS GFSX <sub>1</sub> S RYSVY WX <sub>2</sub> RQP			
41	51	61	71
PGKGX <sub>3</sub> EWX <sub>4</sub> GM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVX <sub>5</sub> L KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTT <sub>1</sub> VT VSS			

5 en la que:

- X<sub>1</sub> es I y X<sub>2</sub> es V;
- X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es I;
- X<sub>1</sub> es V y X<sub>2</sub> es V;
- X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es L; o
- 10 X<sub>1</sub> es L y X<sub>2</sub> es V; y
- X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H;
- X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y
- X<sub>5</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R o H; y comprendiendo dicho dominio variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos

1	11	21	31
ELQLT QSPLS LPVX <sub>6</sub> L GX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> AS ISCRS SQSLX <sub>9</sub> NSNGN TYLHW			
41	51	61	71
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI			
81	91	101	111
SRVEA EDX <sub>10</sub> GV YX <sub>11</sub> CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR			

en la que:

- X<sub>6</sub> es N, Q, S, T, Y, W o C;
- X<sub>7</sub> es D, E, N, Q, S, T, Y, W o C;
- 20 X<sub>8</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C;
- X<sub>9</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;
- X<sub>10</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M; y
- X<sub>11</sub> es N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W o C.



2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:  
 X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;  
 X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M; y  
 X<sub>5</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T o Y.
- 5 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que:  
 X<sub>3</sub> es G, A, V, L, I, P, F, M;  
 X<sub>4</sub> es G, A, V, L, I o M; y  
 X<sub>5</sub> es P, F, W, N, Q, S, T o Y.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que:
- 10 X<sub>1</sub> es L;  
 X<sub>2</sub> es I;  
 X<sub>3</sub> es P;  
 X<sub>4</sub> es M; y X<sub>5</sub> es S.
5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- 15 X<sub>3</sub> es P;  
 X<sub>4</sub> es M; y  
 X<sub>5</sub> es F o X<sub>5</sub> es S, preferentemente S.
6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:  
 X<sub>1</sub> es L; X<sub>2</sub> es V; X<sub>3</sub> es L; X<sub>4</sub> es L y X<sub>5</sub> es F.
- 20 7. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende una región constante de un anticuerpo humano, preferentemente una región constante de IgG.
8. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha región constante es una región que es deficiente en la activación del complemento, preferentemente región constante de IgG<sub>4</sub> humana o una región constante de IgG<sub>1</sub> humana mutada.
- 25 9. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y/o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 siendo el anticuerpo un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano antagonista.
- 30 12. Un anticuerpo monoclonal antagonista anti-CD40 humano de acuerdo con la reivindicación 11 estando el anticuerpo desinmunizado.
13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12 en el que  
 X<sub>6</sub> es T o S, X<sub>7</sub> es D o Q, X<sub>8</sub> es Q o P, X<sub>9</sub> es V o A, X<sub>10</sub> es V o L y X<sub>11</sub> es F o Y.
14. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que:
- 35 X<sub>6</sub> es T, X<sub>7</sub> es Q, X<sub>8</sub> es P, X<sub>9</sub> es A, X<sub>10</sub> es V y X<sub>11</sub> es Y.
15. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14.
16. Una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 o un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 15.
17. Una célula de acuerdo con la reivindicación 16, que produce dicho anticuerpo.
- 40 18. Una célula de acuerdo con la reivindicación 10, 16 o 17, que es una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster chino, una célula NSO o una célula PER-C6<sup>TM</sup>.
19. Un cultivo celular que comprende una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-18.
20. Un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10, 16-18 y recoger dicho anticuerpo de dicho cultivo.

21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, 11-13, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o 15 y/o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 16-18.

5 22. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, 11-14, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o 15 y/o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 16-18 para su uso como un medicamento.

10 23. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, 11-14, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o 15 y/o una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 16-18 para la fabricación de un medicamento para aliviar un síntoma de un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio y/o para reducir el rechazo de trasplantes y/o para el tratamiento de cánceres positivos para CD40.

24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23 en el que dicho trastorno autoinmune y/o uno inflamatorio se selecciona del grupo de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, penfigoide ampollar y dermatitis atópica.

15 25. Uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicho trastorno autoinmune y/o uno inflamatorio comprende enfermedad inflamatoria del intestino.

26. Uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino comprende colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD).

20 27. Un procedimiento para seleccionar un anticuerpo antagonista anti-CD40 humano que comprende generar un primera línea celular que produce un anticuerpo antagonista anti-CD40 original y determinar la cantidad de anticuerpo original que produce dicha primera línea celular, comprendiendo dicho anticuerpo original la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

```

1           11           21           31
|           |           |           |
ELQLT QSPLS LPV T L G Q P AS ISCRS SQSL A NSNGN TYLHW

41           51           61           71
|           |           |           |
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI

81           91           101          111
|           |           |           |
SRVEA ED V GV Y Y CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR :
```

y la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada

```

1           11           21           31
|           |           |           |
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX1S RYSVY WX2RQP

41           51           61           71
|           |           |           |
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK

81           91           101          111
|           |           |           |
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS
```

en la que  $X_1$  y  $X_2$  se seleccionan por pares del grupo que consiste en  $X_1 = I$  y  $X_2 = V$ ;  $X_1 = L$  y  $X_2 = I$ ;  $X_1 = V$  y  $X_2 = V$ ;  $X_1 = L$  y  $X_2 = L$ ; o  $X_1 = L$  y  $X_2 = V$ ,

comprendiendo dicho procedimiento además

- 5 generar al menos una línea celular adicional que produzca una variante de dicho anticuerpo original en la que dicho anticuerpo variante es un anticuerpo original modificado que comprende una inserción, delección, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos en comparación con dicho anticuerpo original, en la que dicha modificación no consiste en una modificación de los aminoácidos en la posición o las posiciones identificadas por  $X_1$  y  $X_2$ , y determinar la cantidad de anticuerpo variante que produce dicha al menos una línea celular adicional,
- 10 comprendiendo además dicho procedimiento seleccionar un anticuerpo variante que se produjo en una cantidad que era al menos el 50 % de la cantidad del anticuerpo original.

28. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicha inserción, delección, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos es en dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada o dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera en comparación con la secuencia de aminoácidos de cadena correspondiente en dicho anticuerpo original.

- 15 29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicha inserción, delección, inversión y/o sustitución de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos es en dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada en comparación con dicha secuencia de cadena pesada de dicho anticuerpo original.

30. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además generar una línea celular productora de anticuerpos que produzca dicho anticuerpo seleccionado.

- 20 31. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30, que comprende además recoger dicho anticuerpo seleccionado.

Figura 1

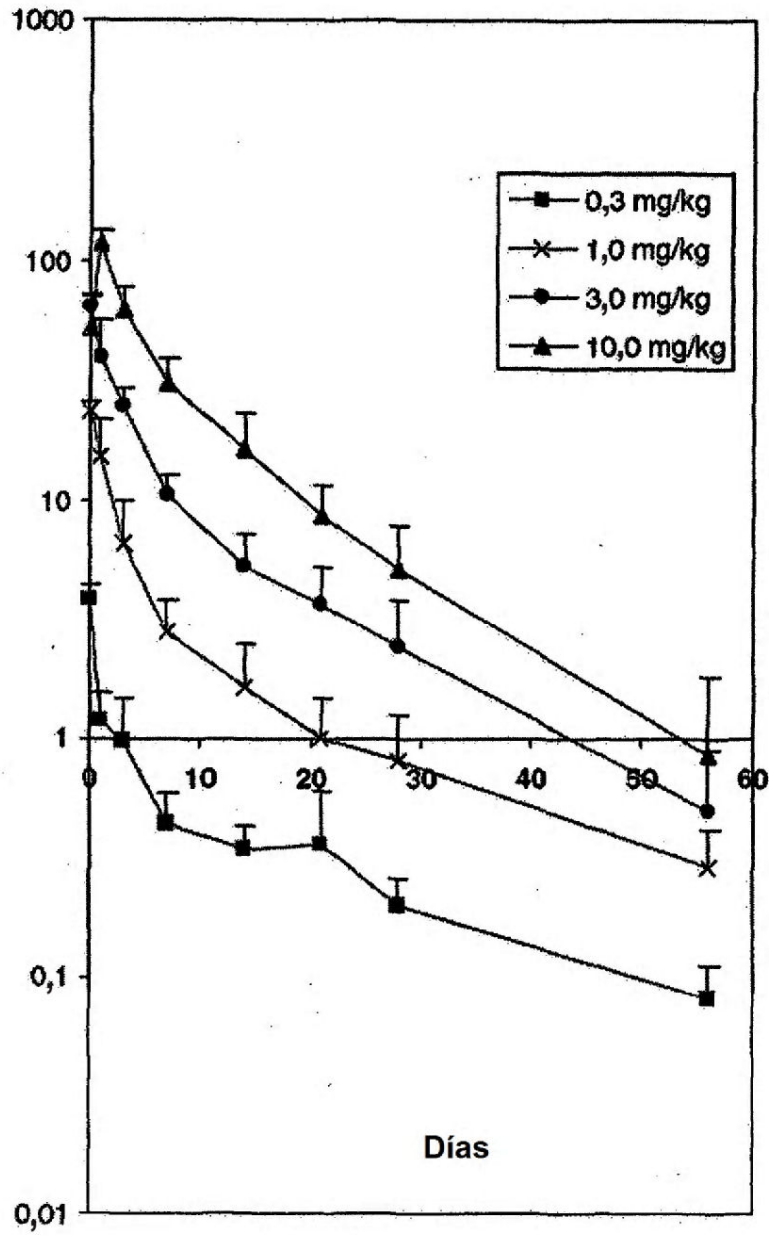


Figura 2

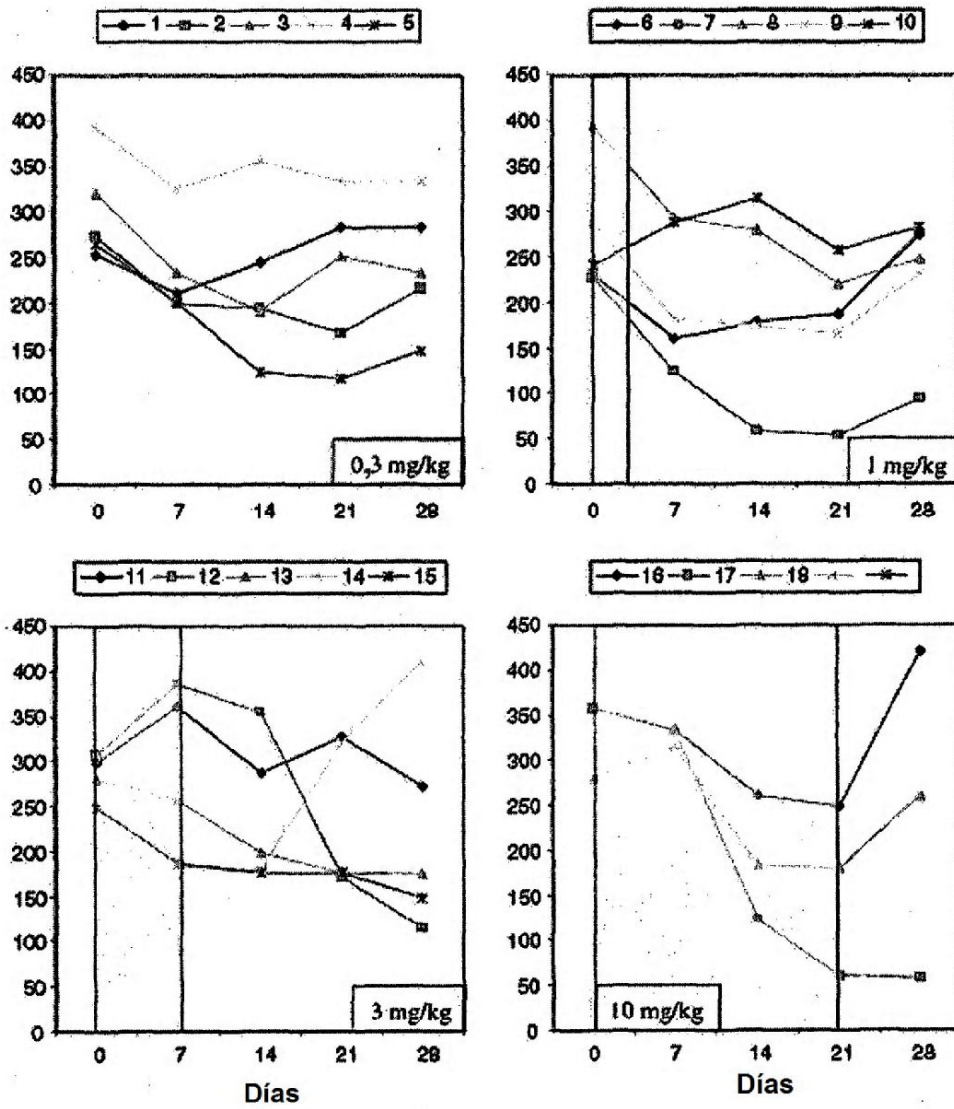


Figura 3

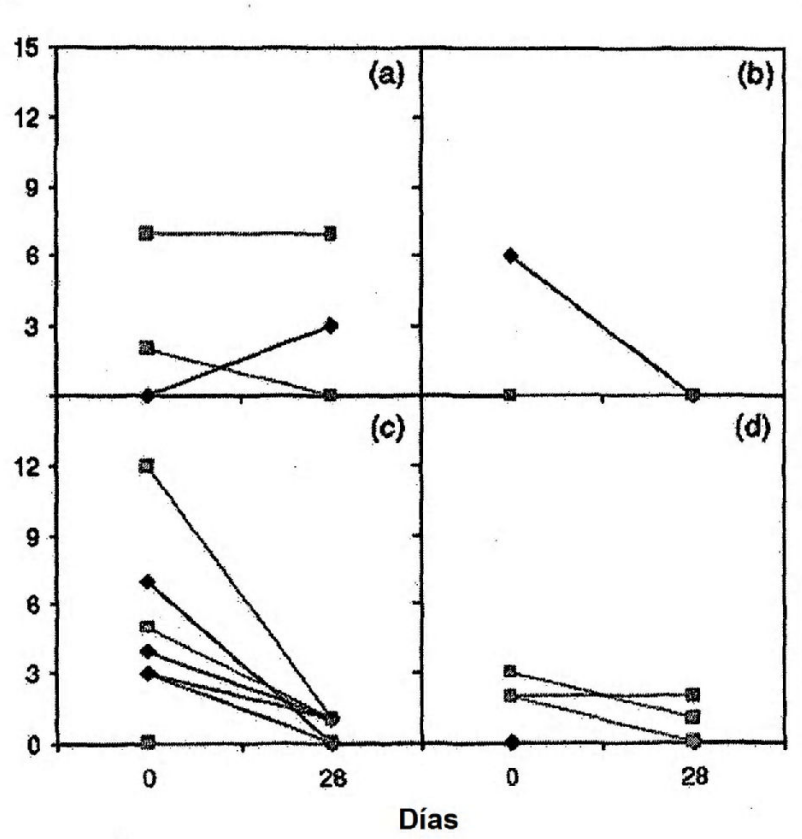
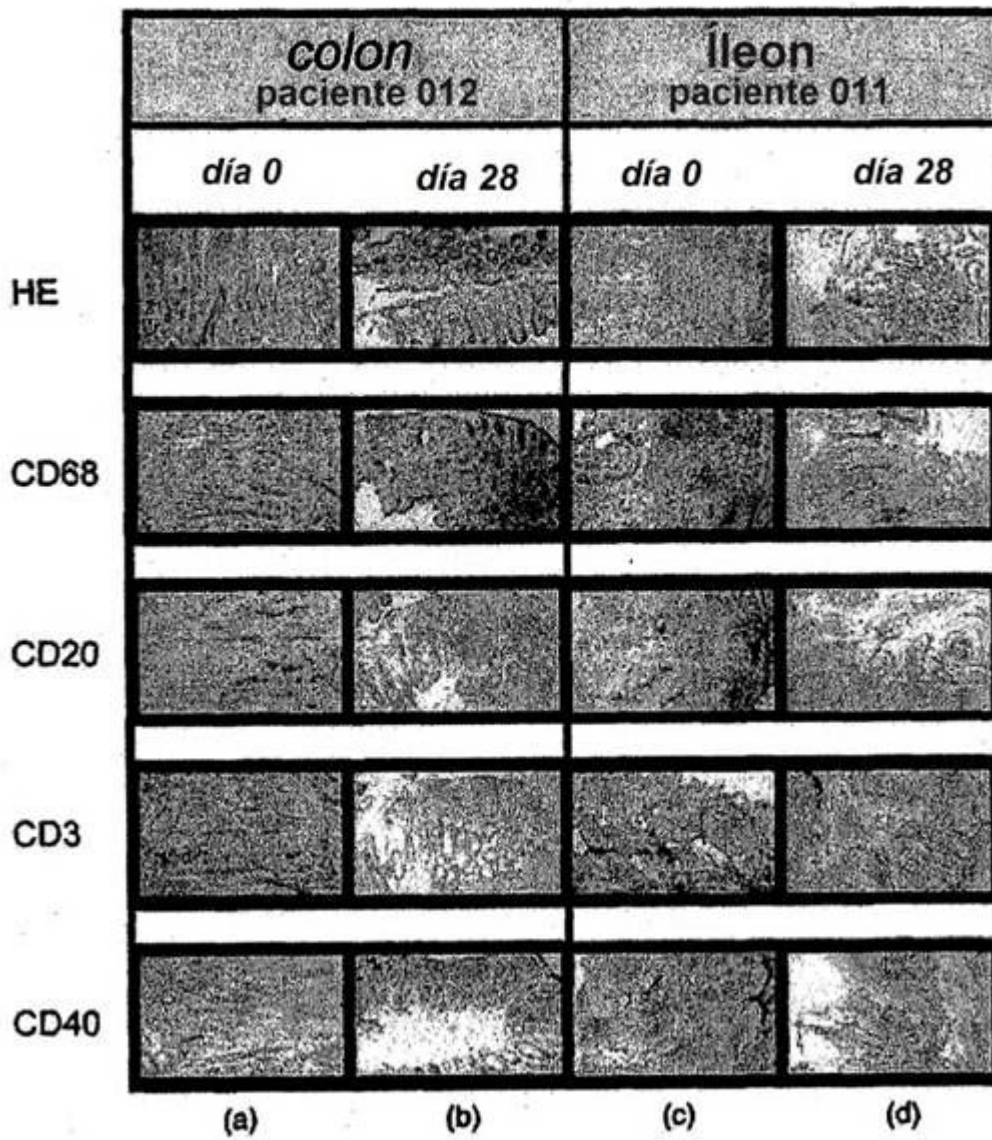


Figura 4



**Figura 5**

Región VH de Mu5D12

Q V K L	E E S	G P G	L V A P	S Q S	L S I
10	20	30	40	50	60
CAGGTCAAGC	TCGAGGAGTC	TGGACCTGGC	CTGGTGGCAC	CCTCACAGAG	CCTGTCCATC
GTCCAGTTTCG	AGTCCTCAG	ACCTGGACCG	GACCACCGTG	GGAGTGTCTC	GGACAGGTAG
T C T V	S G F	S L S	R Y S V	Y W V	R Q P
70	80	90	100	110	120
ACATGCACTG	TCTCTGGGTT	CTCATTATCC	AGATATAGTG	TATACTGGGT	TCGCCAGCCT
TGTACGTGAC	AGAGACCCAA	GAGTAATAGG	TCTATATCAC	ATATGACCCA	AGCGGTCGGA
P G K G	L E W	L G M	M W G G	G S T	D Y N
130	140	150	160	170	180
CCAGGAAAGG	GTCTGGAGTG	GCTGGGAATG	ATGTGGGGTG	GTGGATCCAC	AGACTATAAT
GGTCTTTCC	CAGACCTCAC	CGACCCTTAC	TACACCCAC	CACCTAGGTG	TCTGATATTA
S A L K	S R L	S I S	K D T S	K S Q	V F L
190	200	210	220	230	240
TCAGCTCTCA	AATCCAGACT	GAGCATCAGC	AAGGACACCT	CGAAGAGCCA	GGTCTTCTTA
AGTCGAGAGT	TTAGGTCTGA	CTCGTAGTCG	TTCTGTGGA	GCTTCTCGGT	CCAGAAGAAT
K M N S	L R T	D D T	A M Y Y	C V R	T D G
250	260	270	280	290	300
AAAATGAACA	GTCTGCGAAC	TGATGACACA	GCCATGTACT	ACTGTGTGAG	AACCGATGGG
TTTTACTTGT	CAGACGCTTG	ACTACTGTGT	CGGTACATGA	TGACACAGTC	TTGGCTACCC
D Y W G	Q G T	S V T	V S S		
310	320	330	339		
GACTACTGGG	GTCAAGGAAC	CTCAGTCACC	GTCTCTCA		
CTGATGACCC	CAGTTCCTTG	GAGTCAGTGG	CAGAGGAGT		

Región VL de Mu5D12

E L Q L	T Q S	P L S	L P V S	L G D	Q A S
10	20	30	40	50	60
GAGCTCCAGC	TGACCCAGTC	TCCACTCTCC	CTGCCTGTCA	GTCTTGGAGA	TCAAGCCTCC
CTCGAGGTTCG	ACTGGGTCAG	AGGTGAGAGG	GACGGACAGT	CAGAACCTCT	AGTTCGGAGG
I S C R	S S Q	S L V	N S N G	N T Y	L H W
70	80	90	100	110	120
ATCTCTTGCA	GATCTAGTCA	GAGCCTTGTA	AACAGTAATG	GAAACACCTA	TTTACATTGG
TAGAGAACGT	CTAGATCAGT	CTCGGAACAT	TTGTCAATAC	CTTTGTGGAT	AAATGTAACC
Y L Q K	P G Q	S P K	L L I Y	K V S	N R F
130	140	150	160	170	180
TACCTGCAGA	AGCCAGGCCA	GTCTCCAAAG	CTCCTGATCT	ACAAAGTTTC	CAACCGATTT
ATGGACGTCT	TCGGTCCGGT	CAGAGGTTTC	GAGGACTAGA	TGTTTCAAAG	GTTGGCTAAA
S G V P	D R F	S G S	G S G T	D F T	L K I
190	200	210	220	230	240
TCTGGGGTCC	CAGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTCC	ACTCAAGATT
AGACCCACAGG	GTCTGTCCAA	GTCACCGTCA	CCTAGTCCCT	GTCTAAAGTG	TGAGTCTTAA
S R V E	A E D	L G V	Y F C S	Q S T	H V P
250	260	270	280	290	300
AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TCTGGGAGTT	TATTTCTGCT	CTCAAAGTAC	ACATGTTCCG
TCGTCTCACC	TCCGACTCCT	AGACCCTCAA	ATAAAGACGA	GAGTTTCATG	TGTACAAGGC
W T F G	G G T	K L E	I K R		
310	320	330	339		
TGGACGTTTCG	GTGGAGGCAC	CAAGCTGGAA	ATCAAACGT		
ACCTGCAAGC	CACCTCCGTG	GTTCCGACCT	TAGTTTGCA		



Figura 6

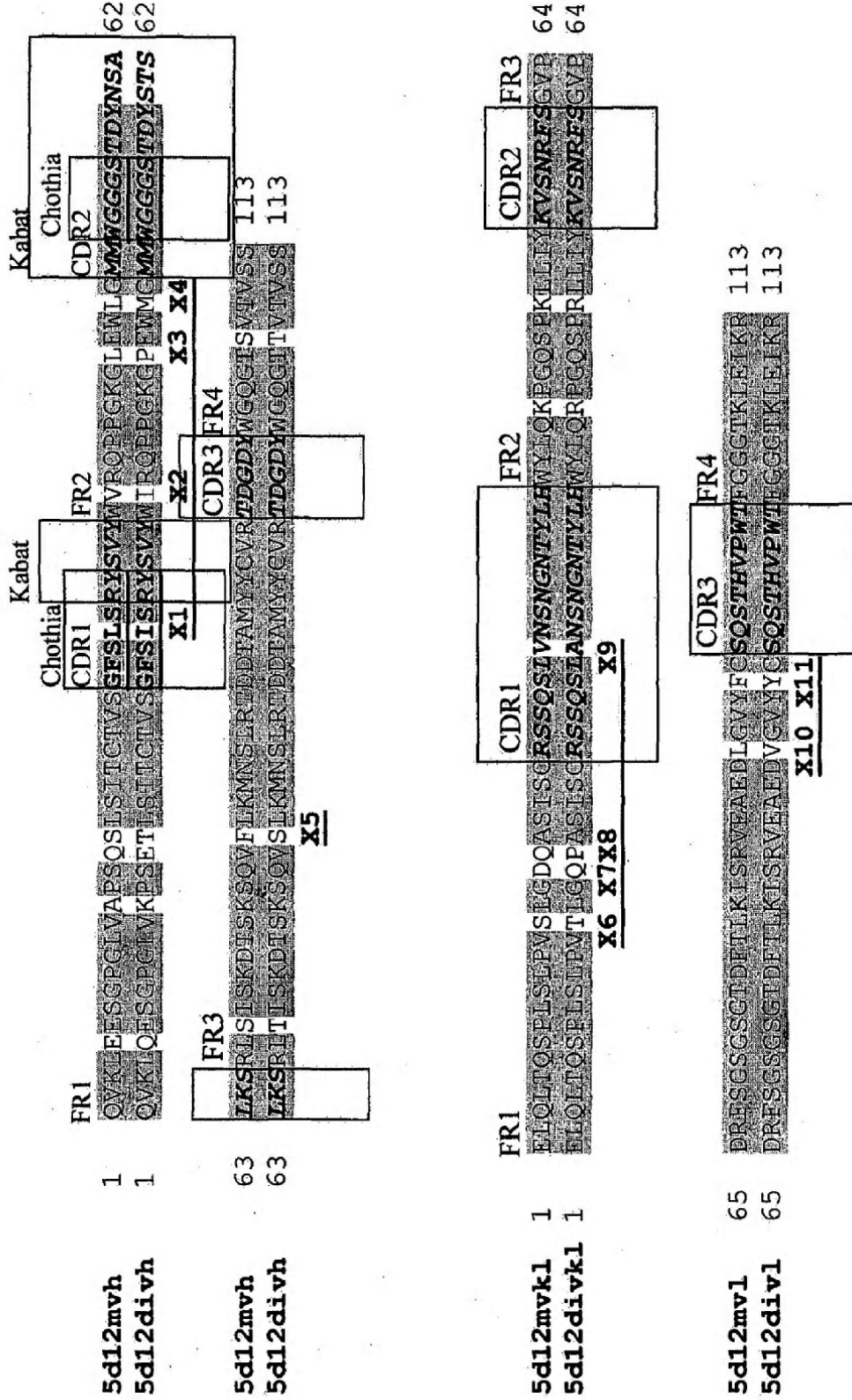


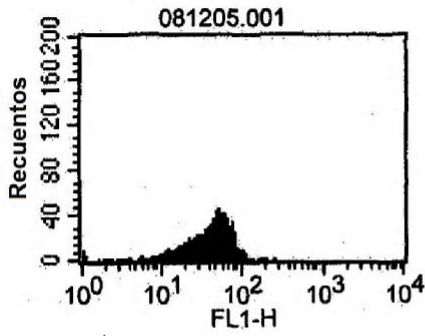
Figura 7

12 variantes DI5D12VH

1.	Q5E	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
2.	K13A	1	QVKKQESGPGCLVAPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
3.	E16Q	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
4.	T17S	1	QVKKQESGPGCLVKPSESLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
5.	I29L	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
6.	I37V	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
7.	P45L	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGLPENMGMWGGGSTDYS	60
8.	M48L	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENLGMWGGGSTDYS	60
9.	STS60NSA	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYN	60
10.	T68S	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
11.	S79F	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
12.	T108S	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
	CH5D12	1	QVKKQESGPGCLVAPSQSLITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGLPENLGMWGGGSTDYN	60
	DI5D12	1	QVKKQESGPGCLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYWIROPFGKGPENMGMWGGGSTDYS	60
1.	Q5E	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
2.	K13A	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
3.	E16Q	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
4.	T17S	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
5.	I29L	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
6.	I37V	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
7.	P45L	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
8.	M48L	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
9.	STS60NSA	61	SALKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
10.	T68S	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
11.	S79F	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVFLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
12.	T108S	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
	CH5D12	61	SALKSRITTSKDTSKSQVFLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113
	DI5D12	61	TSLKSRITTSKDTSKSQVSLKMNLSLRDDETAMYCVRTDGDYWGQCTTVTVSS	113

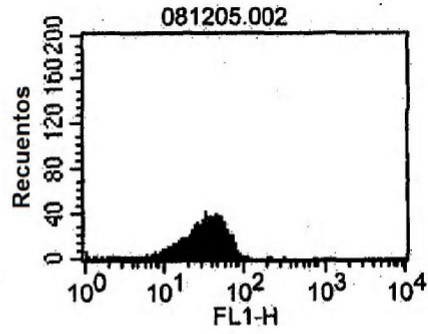
Figura 8 Datos de FACS

Q5E



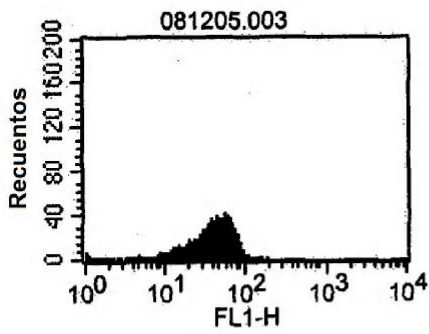
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	39,05	37,52

K13A



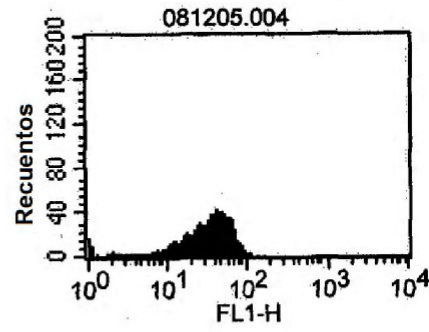
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	31,22	29,96

E16Q



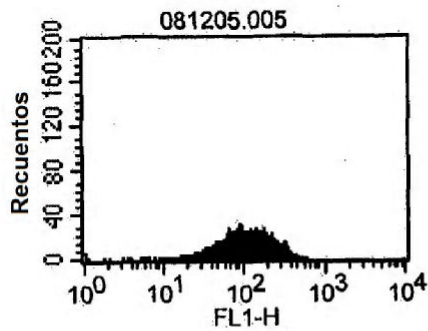
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	39,48	38,20

T17S



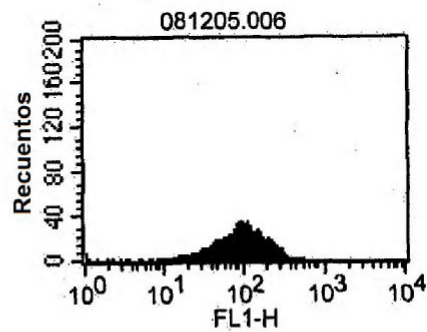
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	33,43	31,91

I29L



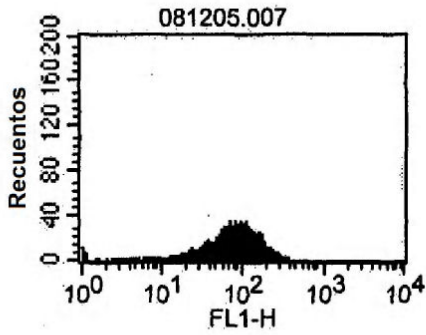
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	108,28	91,81

I37V



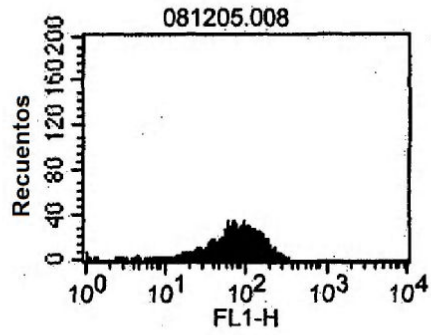
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	96,05	82,05

P45L



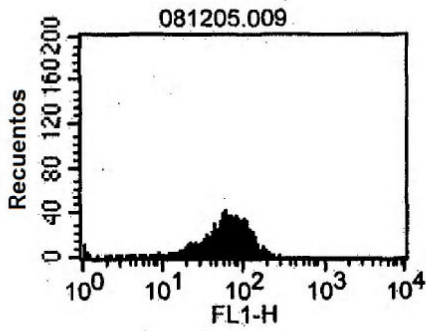
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	82,53	74,32

M48L



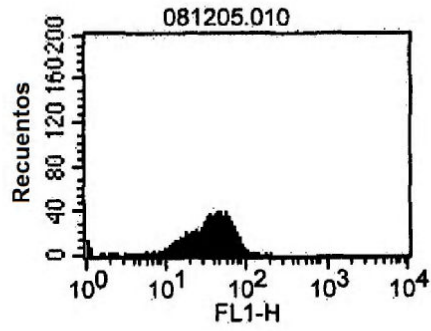
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	80,30	72,34

STS60NSA



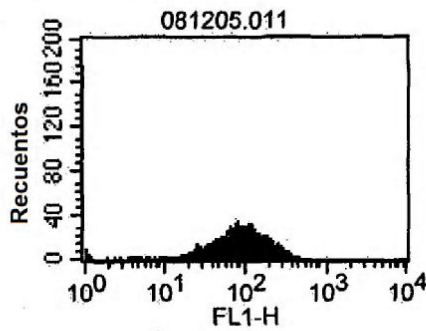
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	62,37	58,82

T68S



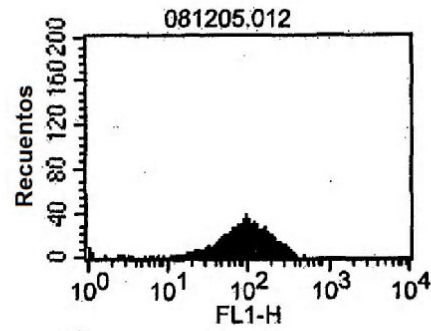
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	35,21	33,98

S79F



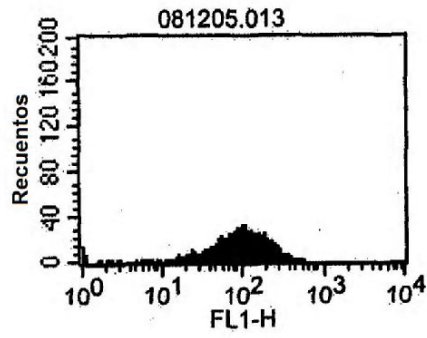
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	96,40	82,05

T108S



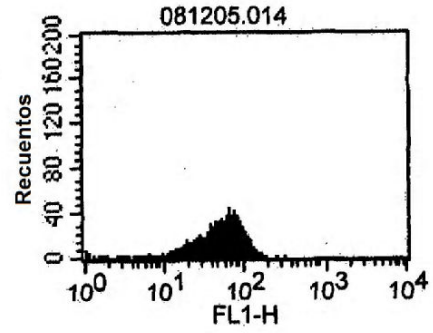
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	99,04	85,82

Ch5D12



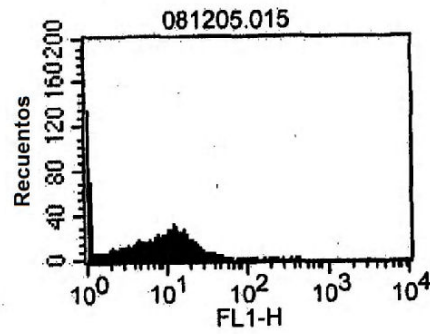
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	102,97	88,96

DI5D12



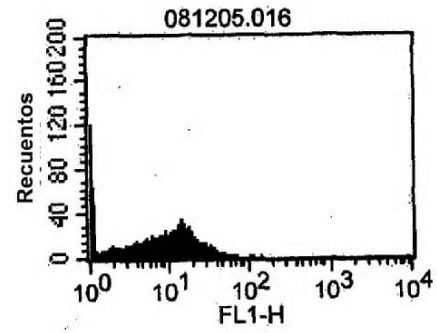
% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	50,44	47,40

Control de simulación



% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	11,25	8,74

Control de FACS



% Seleccionado	Media	Mediana
100,00	10,18	8,74

Figura 9: Variante V-L-I de DI5D12VH

1.	IV	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
2.	VI	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
3.	IL	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
4.	VV	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
5.	LL	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
6.	VL	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
7.	LV	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
CH5D12	(PG100)	1	QVRLQESGPEGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKLEWLCMMWGGSTDYNSA 62
DI5D12	(II)	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
PG102	(LI)	1	QVRLQESGPEGLVKPSETLSITCTVSGFSLSRYSVYVWVROPPGKGPENMGMMWGGSTDYSTS 62
1.	IV	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
2.	VI	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
3.	IL	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
4.	VV	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
5.	LL	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
6.	VL	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
7.	LV	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
CH5D12	(PG102)	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
DI5D12	(II)	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113
PG102	(LI)	63	LKSRITTSKRDTSKSOVSLRMNSLRDDEDTAMYYCVRTDGDYWGCGTTVTVSS 113

Figure 10: Distribución de la productividad de anticuerpos para líneas celulares GS-CHO que producen el anticuerpo PG102 y cultivos de placas de 24 pocillos con "crecimiento excesivo"

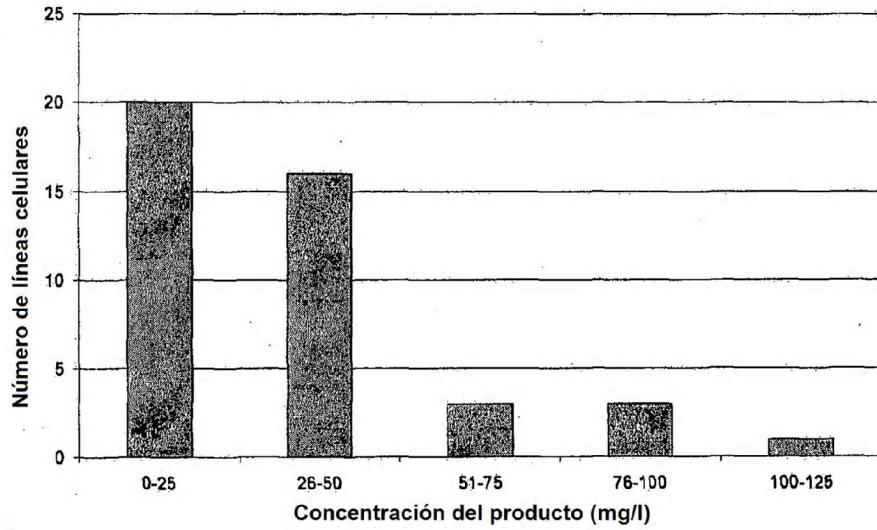


Figura 11: Perfiles de crecimiento y acumulación de anticuerpos para las líneas celulares L107 (DC1; panel superior), L25 (DC2; panel medio) y M95 (DC3; panel inferior) en cultivo en matraz de agitación semicontinuo CDACF

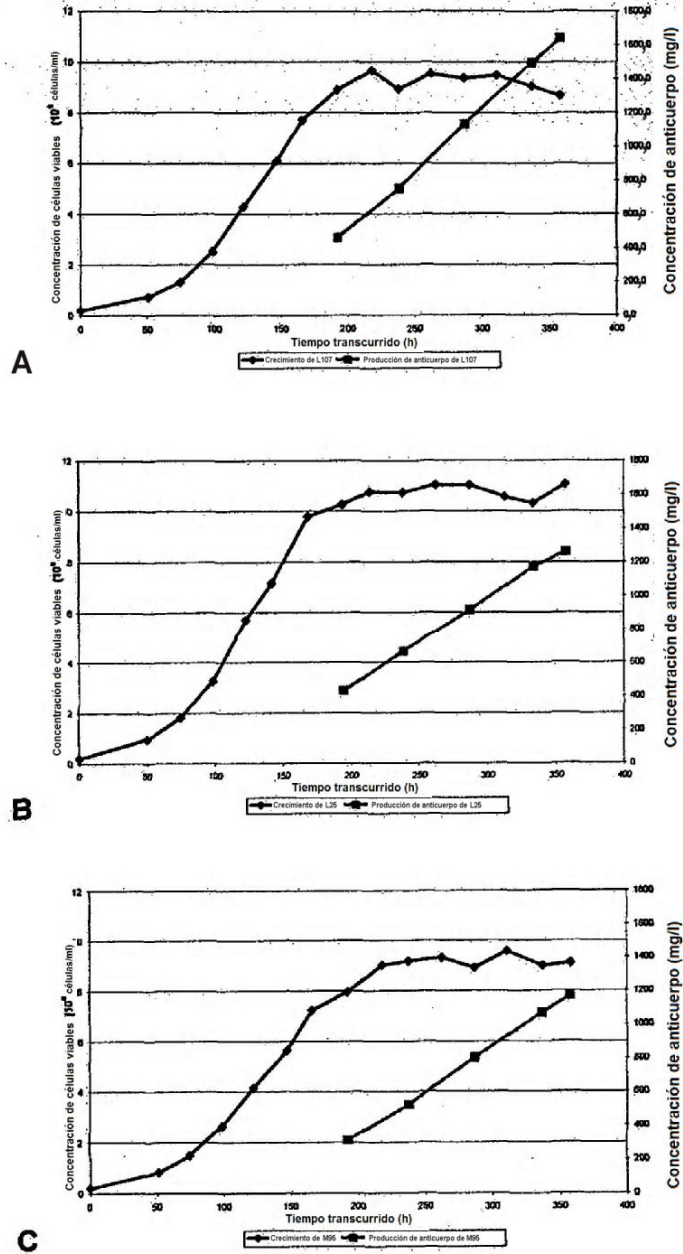
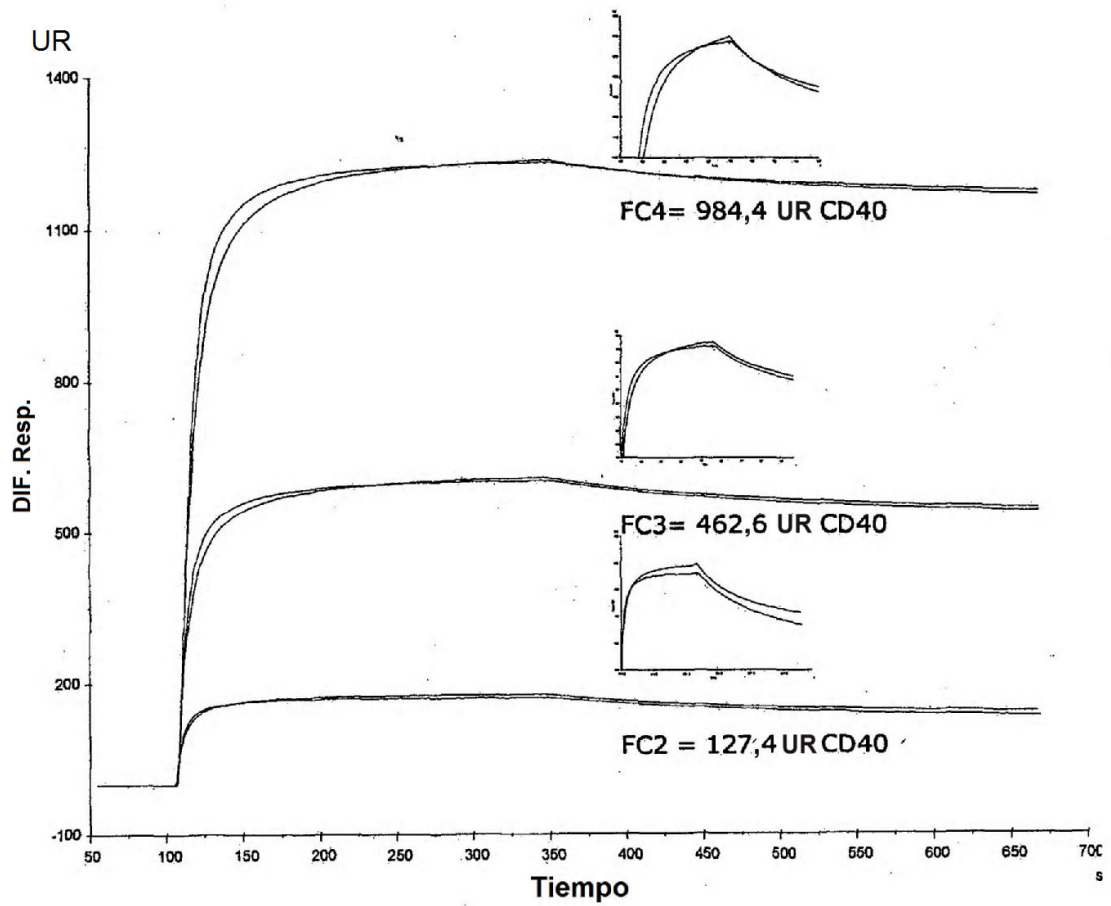
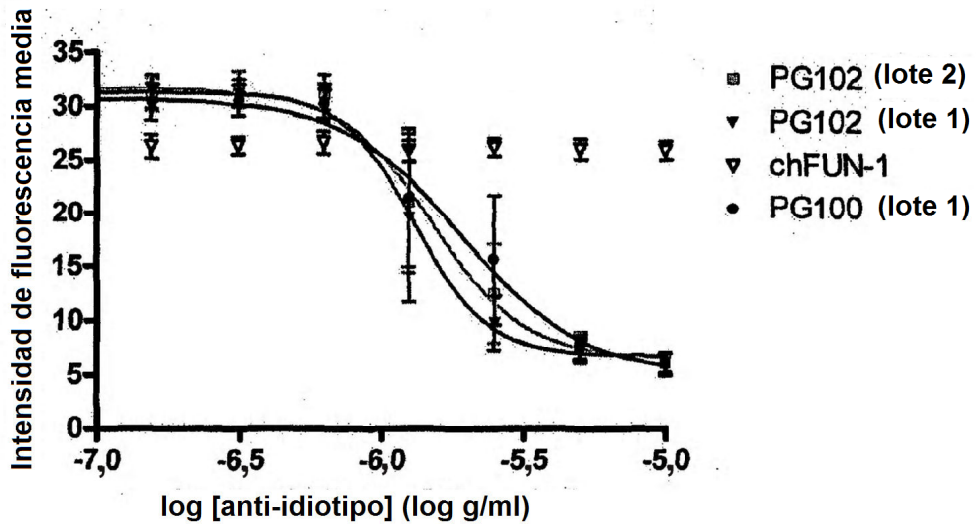




Figura 12: Comparación de la unión de PG102 (rojo) y PG100 (azul) a 10 µg/ml con CD40 inmovilizado a 3 niveles diferentes





**Figura 13** Inhibición de la unión de mAb de CD40 con células JY que expresan CD40 humano por el anti-idiotipo mAb 173-36-1. Los mAb anti-CD40 se ensayaron a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los datos indican la media  $\pm$  e.t. de la media de 4 determinaciones separadas para cada anticuerpo.

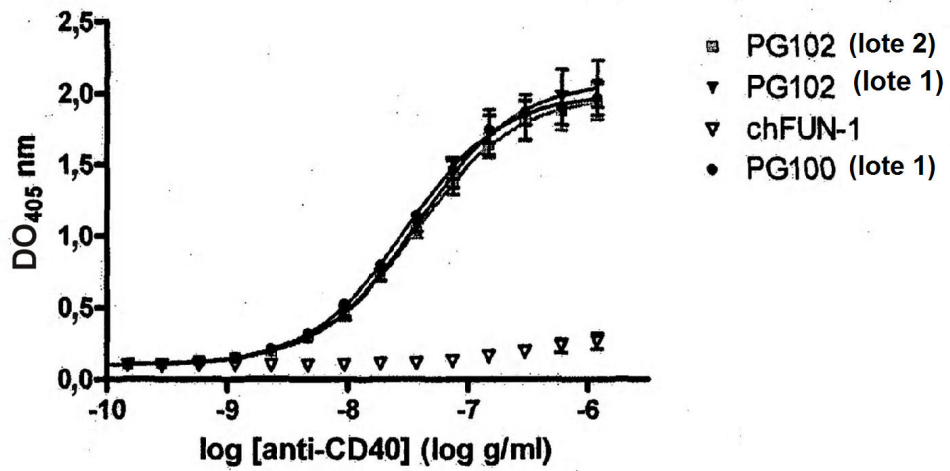
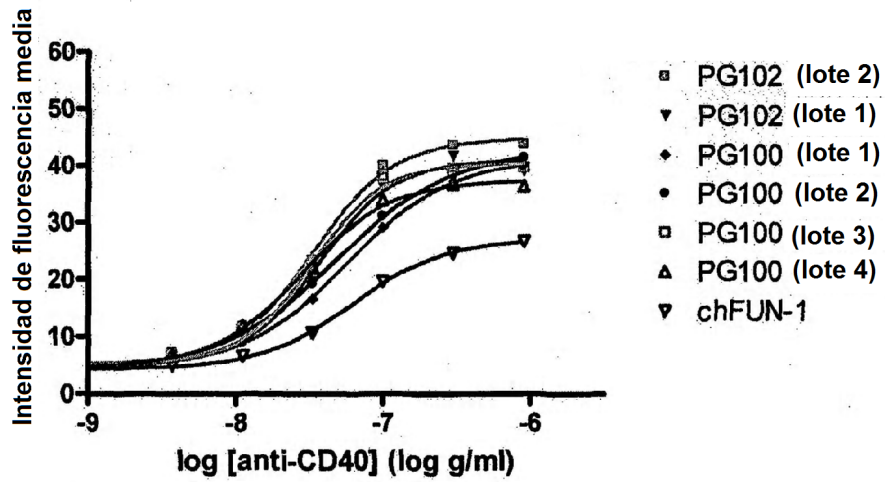


Figura 14: ELISA de CD40-Fc. Unión relacionada con la concentración de PG100 y PG102 con CD40-Fc humano. Las placas se revistieron durante una noche con 250 ng/ml de CD40-Fc humano. El mAb, de control de isotipo chFUN-1, se dirige contra CD86 humano. Los datos indican la media  $\pm$  e.t. de la media (todos n = 3).



**Figura 15:** Cuantificación por FACS de la unión de mAb anti-CD40 con células JY; PG10D y PG102 presentaron concentraciones de unión semimáximas comparables. El mAb anti-CD86, chFUN-1, también mostró unión con células JY en estos experimentos debido a la expresión en superficie de CD86 humano por esta línea celular. Los datos indican la media de determinaciones por duplicado para cada anticuerpo.

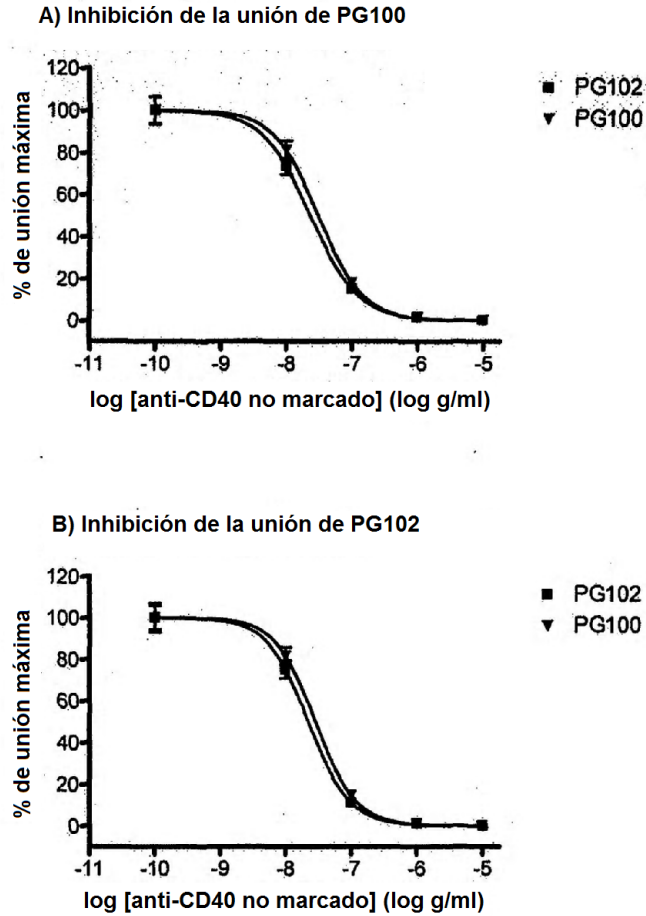


Figura 16. Inhibición de la unión de PG100PE y PG102PE con células JY por anticuerpos de PG100 y PG102 no marcados. Se incubaron PG100 (A) y PG102 (B) marcados a 1  $\mu\text{g/ml}$  en presencia de una concentración creciente de anticuerpo no marcado competidor. La unión de anticuerpo marcado se determinó como intensidad de fluorescencia media (IFM) por citometría de flujo. La IFM para la unión de PG100PE y PG102PE fue de 369 unidades de fluorescencia (A) y 305 unidades de fluorescencia (B), respectivamente. Los datos indican la media  $\pm$  e.t. de la media de 4 experimentos separados.

Figura 17: Inhibición de liberación de IL-8 por células THP-1 después de cocultivo con células Jurkat

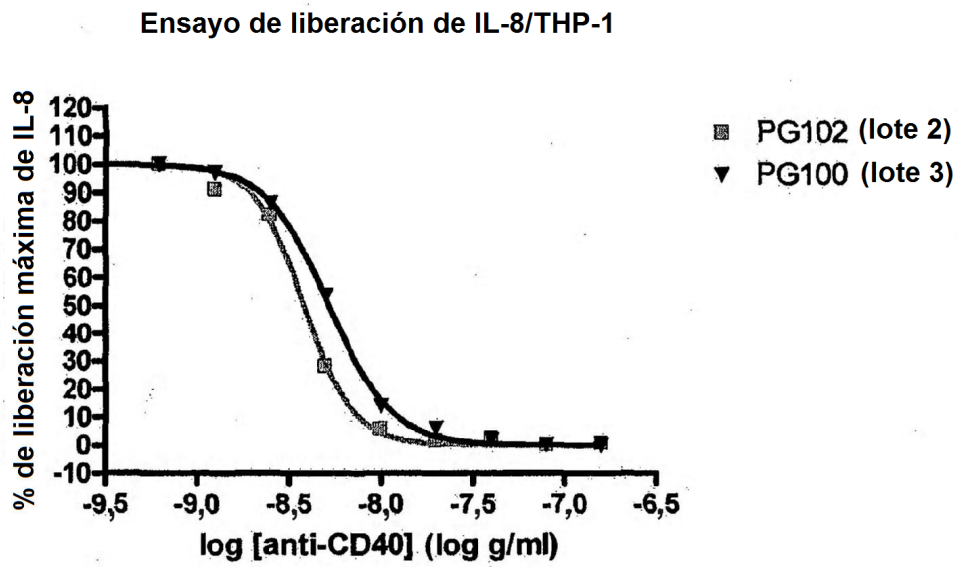


Figura 18

**Secuencia proteica de cadena pesada y ligera de PG102**

Las secuencias señal están subrayadas, las regiones variables en negrita.

Cadena pesada:

MSVPTQVLGLLLLLWLT**DARCELQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLANSNGNTYLHWYLQRP**  
**GQSPRLLIYKVSNRFS**GVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPTFGGGTKLE  
**IKRTVAAPSVFI**FPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena ligera:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS**QVKLQESGPGLVKPS**ETLSITCTVSGFSLSRYSVYWI**RQPPGKGPE**  
**WMGMWGGG**STDYSTSLKSRLTISKDTSKSQVSLKMN**SLRTDDTAMYICV**RTDGDYNGQGT**TVTV**  
**SSASTK**GPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
 SLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMSRTPVETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
 SLGK

**Secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de PG102**

Las secuencias señal se indican subrayadas, las regiones variables en negrita y los codones de parada en minúscula.

Cadena pesada:

ATGGAGTGGTCTTGGGTGTTCTGTCTTCTCCTGTCTGTGACAACAGGAGTGGACTCTCAGGTCAA  
**GCTGCAGGAGTCTGGACCAGGACTGGTGAAGCCATCTGAGACCCTGAGCATCACCTGTACAGTGA**  
**GCGGCTTCAGCCTCTCTAGATACAGCGTGTACTGGATCAGACAGCCACCTGGAAGGGACCAGAG**  
**TGGATGGGAATGATGTGGGGAGGAGGATCTACAGACTACAGCACCAGCCTGAAGTCTAGACTGAC**  
**CATCAGCAAGGACACCTCTAAGTCTCAGGCTCTCCCTGAAGATGAACTCTCTGAGAACAGACGACA**  
**CCGCCATGTACTACTGTGTGAGAACCAGCGGAGATTATTGGGGACAGGGCACAACAGTGACAGTG**  
**TCCTCTGCCTCTACAAAGGGACCATCTGTGTTTCCACTGGCCCATGTTCTAGATCTACCAGCGA**  
**GTCTACAGCTGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCTGTGACAGTGTCTTGA**  
**ATAGTGGAGCCCTGACATCTGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTAGCGGACTGTAT**  
**TCTCTGTCCAGCGTGGTGCAGTGCATCTTCTCTGCGCCACCAAGACCTACACATGTAACGT**  
**GGACCACAAGCCATCTAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGTCTAAGTACGGACCACCATGCC**  
**CATCTTGTCCAGCTCCAGAGTTTCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTTCTGTTCCTCCCAAAGCCAAAG**  
**GATACCCCTGATGATCTCTAGAACCCAGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAGGA**  
**TCCAGAGGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGAGTGGAGTGCACAACGCTAAGACAAAGCCAA**  
**GAGAGGAGCAGTCAACAGCACATACAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGCATCAGGATGG**  
**CTGAACGGCAAGGAATACAAGTSTAAGTCTCCAACAAGGGCCTGCCATCTTCTATCGAGAAAAC**  
**CATCTCTAAGGCTAAGGGACAGCCAAGGGAGCCACAGGTGTACACACTGCCACCATCTCAAGAGG**  
**AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGATTCTACCCATCTGATATCGCT**  
**GTGGAGTGGGAGTCTAATGGACAGCCCAGAGAACAATAAGACCACACCACAGTGTGGATTCTC**  
**TGACGGCTCTTCTTCTGTACAGCAGACTGACAGTGGACAAGTCTAGATGGCAGGAGGGAAACG**  
**TCTTTAGCTGTAGCGTGTGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACCCAGAAGTCTCTGTCTCTG**  
**AGTCTGGGAAAAtgatag**

Cadena ligera:

ATGTCTGTGCCAACACAGGTGCTGGGACTGCTGCTGTGGCTGACAGATGCTAGATGTGAGCT  
**GCAGCTGACACAGTCTCCACTGTCTTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTAGCATCAGCTGTA**  
**GAAGCTCTCAGTCTCTGGCCAACTCTAACGGCAACACATACCTGCATTGGTATCTGCAGAGACCA**  
**GGACAGTCTCCAAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTCTCTGGAGTGCCAGACAGATT**  
**TTCTGGCTCTGGCTCTGGAACAGACTTCACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG**  
**GAGTGTACTACTGCTCTCAGTCTACACATGTGCCATGGACATTCGGAGGAGGAACAAAGCTGGAG**  
**ATCAAGAGAACAGTGGCTGCCCCATCTGTGTTTATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGCTGAAGTC**  
**TGGAACAGCTTCTGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCAAGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGA**  
**AGGTGGACAATGCTCTGCAGTCTGGAACTCTCAGGAGTCTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC**  
**TCTACCTACTCTCTGAGCAGCACACTGACACTGTCTAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA**  
**CGCTGTGAGGTGACACATCAGGGACTGTCTAGCCCAGTGACCAAGTCTTCAACAGAGGGCAGT**  
**GCTgatag**